

UNIVERSITE DE GENEVE
Laboratoire de
microbiologie générale

FACULTE DES SCIENCES
Professeur G. TURIAN

RECHERCHE IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIQUE SUR LA DIFFERENCIATION BIOCHIMIQUE DES NEUROSPORA

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Raffaele PEDUZZI

de

Airolo (TI)

Thèse No 1519

Genève

Centrale universitaire des photocopies

1970

UNIVERSITE DE GENEVE
Laboratoire de
microbiologie générale

FACULTE DES SCIENCES

Professeur G. TURIAN

RECHERCHE IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIQUE SUR LA DIFFERENCIATION BIOCHIMIQUE DES NEUROSPORA

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Raffaele PEDUZZI

de

Airolo (TI)

Thèse No 1519

Genève

Centrale universitaire des photocopies

1970

La faculté des sciences, sur le préavis du Professeur G. TURIAN, directeur de thèse, et d'une commission composée des professeurs Miège, Greppin, et des Drs Pelet et Ahmad-Zadeh, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 3 juin 1970

Le Doyen: Marc VUAGNAT

Thèse N^o 1519



A MES PARENTS,

ces pages dédiées en témoignage de reconnaissance
au directeur de thèse, pour l'intérêt qu'il a porté à
ce travail.

Je remercie le docteur E. ANHÂN-PAULI, du Service
général de médecine de l'Institut d'Hygiène de Buenos
Aires pour son aide et ses précieux conseils.

Je remercie également tous ceux qui ont aidé dans
la réalisation de mon travail.

J'adresse mes remerciements au professeur G. TURIAN,
directeur de thèse, pour l'intérêt qu'il a porté à
ce travail.

Je remercie le docteur C. AHMAD-ZADEH, du Service
d'Immunochimie de l'Institut d'Hygiène de Genève,
pour son aide et ses précieux conseils.

Je remercie également tous ceux qui m'ont aidé dans
la réalisation de mon travail.

I. INTRODUCTION

Des problèmes, à première vue très différents, concernant la génétique, la taxonomie, la morphogenèse et l'enzymologie ont pu être examinés ensemble du fait qu'ils étaient posés en termes biochimiques.

La différenciation morphologique est précédée de sa détermination génétique et de sa différenciation biochimique. La détection de molécules à rôle morphogène peut nous renseigner sur les processus biochimiques responsables des différenciations morphologiques. Dans ces processus les protéines cellulaires tant par leur structure que par leur spécificité jouent un rôle clef. Nous avons décidé d'aborder ce problème de l'apparition de protéines chez un organisme à morphologie relativement simple et génétiquement bien connu, le Neurospora crassa. La caractérisation des protéines spécifiques a été réalisée par des méthodes à haute résolution analytique: l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et l'immunoélectrophorèse.

La première analyse, essentiellement physicochimique, permet de séparer les protéines en les caractérisant selon leur charge électrique et leur taille. Ce deuxième critère étant possible grâce à un phénomène de filtration à travers le gel d'acrylamide qui donne pour deux protéines de même charge électrique une progression dans le gel qui sera inversement proportionnelle à la dimension moléculaire.

La deuxième méthode, immunochimique, s'applique aux macromolécules qui se manifestent comme antigènes et, de ce fait, introduit un critère biologique dans la caractérisation. Cette technique fournit un spectre où les protéines sont séparées selon leur charge et leur réaction immunologique de précipitation antigène - anticorps.

De cette réaction biologique maintenue in vitro découle une restriction. Tous les vertébrés semblent capables de former des anticorps opposés à un très grand nombre de protéines, mais l'appareil immunocompétent de l'animal n'est pas universel de façon à reconnaître absolument toutes les protéines.

Ces deux méthodes ont déjà constitué le procédé de travail d'études fructueuses ayant pour objet les variations de macromolécules protéiniques dans plusieurs domaines biologiques avec les critères de recherche les plus divers. Plusieurs auteurs ont déjà appliqué l'immunochimie à l'étude analytique de mosaïques antigéniques solubles d'origine mycologique. L'application a été orientée surtout vers l'étude de structures antigéniques de dermatophytes et mycoses avec le critère majeur de rechercher une nouvelle possibilité de diagnostic. Le premier à avoir indiqué cette voie a été SEELIGER (1955). La préparation d'immunsérums contre les différentes espèces de mycoses ont permis par la suite de vastes études (SEELIGER, 1968; BIGUET et coll. 1968), concernant surtout différentes espèces de dermatophytes. Pour la raison évidente de trouver une application immédiate permettant un diagnostic rapide, les travaux les plus nombreux concernent la mycopathologie.

Ces travaux mettent l'accent sur le facteur taxonomique pour autant que la parenté antigénique entre espèces soit trop grande pour permettre un diagnostic valable. Dans la plupart des cas cependant les critères immunochimiques assurent une distinction valable des espèces difficiles à séparer morphologiquement.

L'utilisation des méthodes immunologiques a permis à TSUCHIYA (1965) de préciser la classification des moisissures et levures sur la base de la détermination de leur structure antigénique capsulaire par des techniques de agglutination sur lame.

Nous pouvons encore relever que, même si l'école de BIGUET a travaillé essentiellement avec des fractions somatiques solubles et l'école japonaise avec les antigènes capsulaires de surface, généralement insolubles, la similitude des résultats des deux études parallèles est frappante, démontrant ainsi la valeur des méthodes immunochimiques pour la taxonomie. La validité de cette application est démontrée en particulier par la conclusion à laquelle aboutissent les deux écoles, à savoir que Saccharomyces cerevisiae est la forme ascosporee de Candida robusta (TSUCHIYA, 1957; BIGUET, 1962).

L'immunochimie a permis également l'examen de la différenciation protéinique pendant l'ontogenèse, avec le matériel biologique le plus varié. Une série de travaux a été réalisée à ce sujet aussi bien en biologie végétale qu'en biologie animale. RANZI et CROISILLE (1964) ont examiné de façon remarquable l'embryologie de différents animaux en mettant en relief l'apparition progressive de différents constituants caractéristiques de l'adulte et ont mis en évidence des constituants spécifiquement liés à la vie embryonnaire qui disparaissent à un moment donné du développement.

Ces travaux présentent beaucoup d'analogies avec ceux faits sur les Myxomycètes par GREGG (1961) et SONNEBORN (1962, 1964) chez Dictyostelium discoideum. En ce qui concerne cet organisme, les auteurs constatent l'apparition de nouveaux antigènes au cours du développement et la disparition de certains autres, de façon à avoir des composants spécifiques pour chaque étape. Sur un total de 19 fractions antigéniques mises en évidence, quatre seulement persistent au cours de tout le développement. Avec Dictyostelium mucoroides, par une expérience faite avec des anticorps formés contre les spores et conjugués avec la fluorescéine, TAKEUCHI (1963) met l'accent sur la transformation radicale provoquée par l'apparition de l'acrasine et la formation subséquente du pseudoplasmode. En effet, à partir de ce stade, les antigènes de surface restent inchangés jusqu'à la forme sporale.

L'apparition de l'acrasine pourrait être comparée au phénomène d'induction dans l'ontogenèse animale provoquant la formation de nouvelles protéines qui stabilisent le tissu induit et réalisent sa destinée finale.

Pour ce qui est de notre organisme, l'analyse des protéines solubles de Neurospora crassa au moyen de l'immunoélectrophorèse a été introduite par WILLIAMS et TATUM (1961, 1966) avec un critère majeur d'ordre phylétique. Les auteurs relatèrent plutôt les possibilités de recherche avec la méthode d'analyse immunoélectrophorétique (A.I.E.) comme procédé de travail et établissaient un diagramme A.I.E. pour les antigènes de différentes souches, révélés avec les anticorps produits contre les souches sauvages SYR 17-3 A et 37'401-1 (6-3) a. Bien qu'ayant examiné des mutants chimiques et coloniaux, les différences observées dans les arcs de précipitation ne peuvent pas être mises en corrélation avec l'expression d'un caractère morphologique ou biochimique.

SPARCK (1955) a examiné deux souches sauvages:

913_{9a} et (E_{5A} x 1211₃₁)₁₂A, avec des immunsérums produits sur des lapins contre des suspensions conidiennes des deux souches. Ces recherches, avec des techniques d'agglutination, ont démontré que les deux souches cultivées à 25° C étaient antigéniquement différentes, tandis que, cultivées à 35° C, elles étaient antigéniquement identiques. Leur différenciation donc était contrôlée par la température et à 35° C il y avait perte des caractères qui les différenciaient à 25° C. Il était ainsi démontré que, chez Neurospora crassa, les différences antigéniques dépendaient à la fois de facteurs génétiques et du milieu.

Les protéines ribosomiques et les ribosomes de Neurospora crassa ont été analysés immunochimiquement et physicochimiquement (électrophorèse en gel d'acrylamide) par ALBERGHINA et SUSKIND (1967).

Les premières séparations sur gel d'acrylamide de protéines solubles de Neurospora crassa ont été réalisées par CHANG et coll. (1962).

En se référant au schéma classique de la séquence morphogénétique de Neurospora crassa qui décrit un cadre d'évolution chronologique triphasique (TURIAN, 1965, 1969), la présente investigation se situe dans la première phase, au cours de l'événement macroconidiogène. Elle fait ainsi partie du programme de recherche appliquée aux facteurs de contrôle de la macroconidiation qui sont à l'étude depuis plusieurs années dans le laboratoire du Prof. TURIAN.

Notre recherche a été guidée par deux grandes lignes conductrices:

La première concerne l'étude de variations biochimiques dues à la présence de différences génétiques. Pour cela, nous nous sommes placés sur deux plans fondamentaux:

- l'un, g é n é t i q u e, traitant de la détection des différences macromoléculaires vraisemblablement liées à l'aberration morphologique chez deux mutants de Neurospora crassa à conidiation déficiente;
- l'autre, t a x o n o m i q u e, recherchant les affinités d'un micro-organisme d'espèce inconnue avec deux souches sauvages (N. crassa et N. sitophila) génétiquement déterminées, par comparaison des caractères biochimiques qui complètent les données morphologiques.

La deuxième ligne conductrice concerne l'étude des variations biochimiques dues à la différenciation morpho-

génétique. Pour cela, on a envisagé deux étapes consécutives:

- l'une étant la recherche d'une corrélation entre une différence macromoléculaire détectable et l'événement morphogénétique majeur, la conidiation;
- l'autre étant la recherche d'une activité enzymatique, impliquée dans la déviation métabolique, liée à l'événement morphogénétique mis en évidence ci-dessus.

Les résultats de nos différentes expériences seront considérés selon les quatre aspects ainsi définis.

II. M A T E R I E L E T M E T H O D E S

1. MICRO-ORGANISMES EMPLOYES

1.1 Souches de l'espèce Neurospora crassa

La souche sauvage est celle de Lindegren A (LA), c'est-à-dire de signe de compatibilité + (Nc⁺) (BARRATT, 1962).

Les deux mutants morphologiques, à conidiation déficiente:

"fluffy", symbole génique: fl, groupe de liaison II R, (BARRATT, 1954), mutation spontanée, No. 45 A du F.G.S.C.

Expression phénotypique: souche aconidienne présentant un mycélium floconneux incapable de différencier des macroconidies.

"amycelial", symbole génique: amyc, groupe de liaison I L, isol. K 422, mutation spontanée, No. 305 A du F.G.S.C.

Expression phénotypique: souche présentant une croissance hyphale avec différenciation immédiate en cellules conidiennes, mais incapable de séparer ces mêmes cellules différenciées en éléments conidiens libres, d'où son nom d'aschizogène (TURIAN et OULEVEY, 1968).

Les deux souches albinos:

"albinos-2", symbole génique: al-2, groupe de liaison IR: isol. 15300 No. 16 du F.G.S.C., mutant artificiel (HUNGATE, 1945).

"albinos-Chg", mutant isolé de nature (GINDRAT et coll. 1970) aux Stations Fédérales d'Essais Agricoles de Changins, d'où son nom (al-Chg).

Dans le tableau 1, nous avons résumé les capacités morphogénétiques, l'origine et les désignations des différentes souches de l'espèce Neurospora crassa.

1.2 Souche de l'espèce Neurospora sitophila

La souche sauvage de la collection de Baarn, Hollande, de signe de compatibilité A (DODGE, 1930) a été employée à titre comparatif pour la partie taxonomique de notre investigation, afin de permettre la recherche d'affinités parentales entre différentes espèces, selon le critère sérologique.

Au cours de notre exposé, nous avons désigné les souches selon la terminologie génétique simplifiée suivante:

Nc, "fl", "amyc", al-2, al-Chg, N. site.

TABLEAU 1

CAPACITES MORPHOGENETIQUES DES SOUCHES DE NEUROSPORA CRASSA UTILISEES

Souche	Désignation	Crigine	Capacité morphogénétique
Neurospora crassa	Nc+ LA Lindegren +	isolement de la nature (BARRATT, 1962)	Différenciation de macroconidies (entre 2 et 3 jours de culture); microconidies (dès le 4 ^e jour)
"fluffy"	fl (No 45 F.G.S.C.) Iscl. L	mutation spontanée	Mycélium floconneux, à éléments très filamenteux, dépourvu de macroconidies, mais producteur de microconidies.
"amycelial"	amyc (No 305 F.G.S.C.) Isol. K 422	mutation spontanée	Mycélium semi-colonial, à éléments globuleux aschizogéniques
albinos -2	al-2 (No 16 F.G.S.C.) Isol. 15300	mutation induite rayons X (HUNGATE, 1945)	Mycélium normalement conidiogène mais dépourvu de caroténoïdes
albinos-Changins	al-Chg	mutation spontanée, isolement de la nature (GINDRAT et coll. 1970)	Mycélium plus faiblement conidiogène mais dépourvu de caroténoïdes

2. MILIEU DE CULTURE

Nous avons cultivé les différentes souches de Neurospora sur milieu synthétique minimal P (périthécial) de WESTERGAARD & MITCHELL (1947). Sur cette base nutritionnelle, selon les exigences d'expérience, on a choisi comme source de carbone soit le saccharose, soit l'acétate de sodium enrichi ou non de succinate de sodium, selon DICKER et coll. (1969).

Composition des différents milieux employés:

2.1 Milieu de base P

composition	concentration	proportions pour 1 l
KNO_3	1‰	1 g
KH_2PO_4	1‰	1 g
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	0,5‰	0,5 g
NaCl	0,1‰	0,1 g
CaCl_2	0,1‰	0,1 g
Oligoéléments	1‰	1,0 g
FeCl_3	$5 \cdot 10^{-3}$ ‰	5 ml d'une sol. 100 mg/100 ml
Biotine	$2 \cdot 10^{-5}$ ‰	2 ml. d'une sol. 1 mg/100 ml
H_2O distillée		1000 ml

2.2 Milieu Ps

Milieu P + saccharose à une concentration de 2%.

2.3 Milieu Pa

Milieu P + acétate de sodium à une concentration de 2%.

2.4 Milieu Ps + ac.

Milieu P + saccharose et acétate de sodium

La source de C est ainsi répartie:

saccharose	0,2%	2 g/l
acétate	1,8%	18 g/l

2.5 Milieu Ps + succ.

Milieu P + saccharose et succinate de sodium à une concentration de 10^{-2} M.

La source de C est ainsi répartie:

saccharose	1,73%	17,3 g/l
succinate	0,27%	2,7 g/l

2.6 Milieu Pa + succ.

Milieu P + acétate de sodium et succinate de sodium 10^{-2} M.

La source de C est ainsi répartie:

acétate	1,73%	17,3 g/l
succinate	0,27%	2,7 g/l

Tous ces milieux sont préparés sous forme liquide avec de l'eau bidistillée et des produits purissim en ajustant le pH à 6,3 - 6,5 avec de la potasse caustique (KOH).

Il faut relever que la concentration finale de 2% suivant les différentes sources de carbone ne représente pas la même quantité d'atomes de C. En effet, cette quantité varie en fonction des proportions de composants en C_2 et C_6 .

3. CONDITIONS DE CULTURE ET DE RECOLTE

On laisse pousser les cultures en phase liquide agitée dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml contenant 150 ml de milieu. L'agitation est faite avec une secoueuse (Gyrotory Shaker, model R-25, New Brunswick Laboratory apparatus).

Le réglage de celle-ci est fait de façon à avoir un nombre de 100 secousses par minute. La température dans l'enceinte est maintenue constante à 27° C.

L'ensemencement est fait avec des fragments de mycélia âgés de 7 jours et de dimensions aussi égales que possibles ($2 - 3 \text{ mm}^2$) à partir de cultures sur milieu Ps solide.

En vue d'une estimation de la croissance des cultures par mesure du poids lyophilisé ou par dosage des protéines totales, on a préféré ensemençer chaque flacon avec le même nombre de gouttes d'une suspension uniforme de fragments; pour la souche sauvage à partir d'un inoculum conidien de l'ordre de 5.10^5 conidies.

Les mycélia obtenus après un temps de culture de 96 heures (sauf pour les expériences étudiant l'influence du temps de croissance sur les protéines où les récoltes sont faites à des temps variables) sont séparés du milieu au moyen de filtres Buchner avec du papier à filtrer (Schleicher & Schuell - Feldbach, Modèle No. 595, porosité 4,4 microns).

Après trois lavages à l'eau bidistillée, le gâteau mycélien récolté est essoré avec du papier buvard et plongé ensuite dans l'azote liquide (-195° C).

4. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES POUR LES INJECTIONS ET POUR LES TESTS SEROLOGIQUES

Nos techniques d'investigation sérologiques et électrophorétiques n'étant applicables que pour des solutions, on a dû soumettre le mycélium obtenu à plusieurs opérations nécessaires pour l'extraction des constituants cellulaires et leur solubilisation.

D'autre part, cette préparation de substances antigéniques solubles à analyser s'est révélée très délicate, car la sensibilité et la spécificité, qui sont les principaux avantages de la réaction immunologique, seraient compromises par toute contamination (une quantité de l'ordre du microgramme est encore décelable), dénaturation ou modification de constituants qui pourraient survenir au cours d'une extraction.

Tenant compte de toutes ces conditions, après plusieurs expériences, la méthode qui nous a semblé la plus complète et satisfaisante est celle comprenant les étapes de préparation successives ci-dessous:

- 4.1 congélation - décongélation
- 4.2 lyophilisation
- 4.3 broyage et homogénéisation
- 4.4 centrifugation

4.1 congélation - décongélation

Le but de cette première étape est la désagrégation des cellules et de leurs constituants.

Le tissu mycélien après avoir été essoré et congelé avec de l'azote liquide est décongelé dans un bain-marie à + 30° C. Cette opération congélation - décongélation est répétée trois fois de suite.

On a choisi cette méthode plutôt que les ultrasons qui désagrègent facilement les cellules mais qui présentent comme grand inconvénient leur action oxydante.

4.2 lyophilisation

Cette deuxième étape comprend l'élimination de l'eau comme premier constituant moléculaire associé et non protéinique.

L'appareil à lyophiliser employé a les caractéristiques suivantes:

marque: Edwards

pompe à palettes marque Edwards nous permettant l'atteinte d'un vide de 0,3 à 1,5 Torr.

Pour les dernières expériences de notre investigation (partie enzymatique), on a pu disposer d'un appareil beaucoup plus perfectionné, répondant aux données ci-dessous:

- Appareil marque: B-G Electronic, La Tour-de-Peilz.

- Pompe à vide marque: Edwards

- Piège à azote marque: Deward

- Enceinte de forme circulaire de 30 cm de diamètre et 40 cm de hauteur permettant de présenter les produits à lyophiliser sous forme très étalée.
- Plaque chauffante, pour ramener le lyophilisat à la température ambiante.

Sur le même appareil, les contrôles et valeurs de consigne étaient asservis pour les paramètres suivants:

- | | |
|-------------------------|---|
| - Vide | 0,5 à 1,2 Torr |
| - Température plaque | $\leq$ max 20° - 25° C |
| - Température produit | $\leq$ max 20° - 22° C |
| - Résistance électrique | début de l'opération $\approx 10^3 \Omega$
fin de l'opération ∞ |

Les résultats obtenus avec cet appareil n'ont en aucun cas infirmé ceux précédemment acquis.

4.3 broyage et homogénéisation

Réduit en poudre par broyage au mortier en présence de sable de quartz, le matériel brut lyophilisé sera homogénéisé dans un tampon phosphate sodico-potassique 1/15 M, pH 7,2 (selon Sørensen) additionné d'une solution de chlorure de sodium à la concentration finale de 0,018 M.

Toute la manipulation est faite en chambre froide à $+4^{\circ}$ C, après avoir préalablement refroidi mortier et pilon au congélateur à -35° C pendant 5 minutes, afin

d'éviter tout réchauffement pendant le broyage. Pour cette homogénéisation, on a utilisé les proportions de 1 à 1 poids lyophilisé / poids du sable de quartz et de 1 à 12 poids lyophilisé / volume de solution tamponnée. Le broyage manuel au pilon a été préféré à celui avec le broyeur mécanique à cause des échauffements ou production de mousse avec dénaturations subséquentes que ces derniers causent fréquemment.

4.4 centrifugation

L'homogénéisat obtenu a été soumis à une centrifugation réfrigérée à 10.000 g pendant 10 minutes (centrifugeuse marque Christ). Une fois le culot écarté, le surnageant récolté a représenté notre extrait de constituants cellulaires solubles.

Cette mosaïque complexe a été utilisée à la fois comme solution contenant les structures antigéniques à analyser avec différentes techniques sérologiques et aussi comme préparation injectable aux animaux pour la production d'anticorps.

5. EVALUATIONS ET DOSAGES PROTEINIQUES DES EXTRAITS

5.1 Méthode de Lowry avec le réactif de Folin-Ciocalteu

L'évaluation du taux de nos solutions antigéniques a été faite suivant le procédé de LOWRY et coll. (1951). On a pris comme référence standard l'albumine sérique de boeuf B.S.A. (bovine serum albumine - Sigma). Les mesures ont été faites avec un spectrophotomètre Beckman, modèle DB-G, à une longueur d'onde de 750 mμ. Ce procédé est très sensible, détection jusqu'à des quantités de 25 μg.

5.2 Méthode avec la réaction du biuret

Le procédé suivi a été celui de RACUSEN et coll. (1961). La précipitation des protéines avec l'acide trichloracétique (T.C.A.) 20% a été faite à partir d'une aliquote de mycélium lyophilisé. La densité optique a été lue à une longueur d'onde de 540 mμ.

Cette méthode, bien que moins fine que celle de LOWRY est applicable pour des grandes quantités de protéines avec une sensibilité allant jusqu'à 1 mg.

Basée sur la coloration donnée par les liaisons peptidiques en présence d'une solution alcaline de sulfate de cuivre, elle nous a permis d'estimer la concentration en protéines. Ce dosage a été utilisé pour

déterminer les protéines totales du matériel cellulaire afin de pouvoir établir le rapport protéines totales / poids lyophilisé et exprimer ainsi la croissance de la culture.

6. PREPARATION DES ANTISERUMS

Les immunsérums ont été préparés sur des lapins, à partir des trois souches suivantes, cultivées sur Ps:

- 1) *Neurospora crassa* type sauvage.
- 2) *Neurospora crassa* "fl".
- 3) *Neurospora crassa* "amyc".

Avant l'immunisation nous avons prélevé sur chaque lapin environ 10 ml de sang par ponction intraveineuse pour obtenir des sérums témoins.

Chaque animal a reçu au total 90 mg de protéines en trois injections échelonnées selon le schéma suivant:

<u>Jours</u>	<u>Antigène</u>	<u>Voie d'injection</u>
1	1 ml d'homogénat émulsionné avec 1 ml d'adjuvant complet de Freund	intramusculaire
21	1 ml d'homogénat sans adjuvant	sous-cutanée
34	1 ml d'homogénat sans adjuvant	sous-cutanée

Une semaine après la dernière injection, nous avons pratiqué la saignée par ponction cardiaque obtenant des quantités variantes entre 90 et 100 ml de sang.

Pour obtenir le sérum la procédure a été la suivante:

Nous avons laissé coaguler le sang à la température ambiante pendant 2-3 heures et après une nuit au frigo, nous avons éliminé le caillot au moyen d'une centrifugation à 2.000 g pendant 10 minutes. Le sérum ainsi obtenu a été recentrifugé à 10.000 g. Nous avons ensuite ajouté au surnageant du merthiolate (Sigma) à la concentration finale de 1:10.000 pour prévenir une éventuelle croissance de bactéries. Le stockage du sérum a été fait au congélateur dans des petits tubes par quantités de 1 ml.

7. IMMUNODIFFUSION

7.1 Immunoélectrophorèse

En ce qui concerne l'analyse immunoélectrophorétique (A.I.E.), nous nous sommes référés aux techniques décrites par GRABAR et WILLIAMS (1953) et modifiées par SCHEIDEGGER (1955). Sur des lames porte-objet (76 x 26 mm) nous avons coulé une couche de 1 mm d'épaisseur d'un gel d'agarose (Industrie Biologique Française, Gennevilliers, Seine, France) à la concentration de 1% préparé avec du tampon véronal (Na-biethylbarbiturat) à pH 8.2, et de force ionique 0,05.

La séparation électrophorétique de notre mélange antigénique a été faite en chambre froide à +5° C au moyen d'une cuve à migration de marque Shandon. Chaque compartiment de la cuve contenait 500 ml du même tampon véronal-sodique employé pour préparer l'agarose. Le contact entre les lames et le tampon des petites cuves à électrodes était obtenu avec des bandes de papier filtre imbibées du même tampon.

Grâce à de nombreux essais préliminaires, nous avons pu déterminer que, pour notre matériel, le temps de séparation électrophorétique le plus adapté pour une bonne évaluation des résultats était de 60 minutes. Cela a été obtenu en opérant avec une différence de potentiel de 210 volts aux extrémités des 8 lames et une intensité de courant de 5 mAmp. par lame (stabilisateur de courant Büchler modèle No. 3-1014 A). Après électrophorèse, de 0,001 ml d'extrait antigénique, une quantité de 0,050 ml d'immunsérum à une dilution appropriée

a été placée dans les rigoles. Nous avons laissé se développer les arcs de précipitation en chambre humide et à la température ambiante, et nous avons effectué les lectures après 24 et 48 heures. A la fin de cette période de diffusion, les lames ont été lavées avec une solution physiologique, NaCl 9‰ (ajustée à pH 8 avec NaOH 0,1 N), en ayant soin de remplacer ce liquide de lavage 2 fois pendant 48 heures. Ce procédé nous a permis l'élution des protéines en excès qui n'étaient pas précipitées et qui auraient pu rendre difficile l'identification des arcs de précipitation lors de la coloration. Un soigneux lavage à l'eau bidistillée, a été pratiqué après le bain physiologique. Avant de laisser sécher les lames à la température ambiante, un papier filtre imbibé d'eau bidistillée doit être posé directement sur l'agarose.

Pour la mise en évidence des protéines totales (immunoélectrophorégramme complet) après séchage les lames ont été colorées pendant 15 minutes dans une solution de thiazine rot T (Fluka) 1% acide acétique 1%. La décoloration est faite par passages subséquents d'une durée de 15 minutes dans 2 bains d'une solution de méthanol à 70%, acide acétique 1%.

7.2 Test de double diffusion

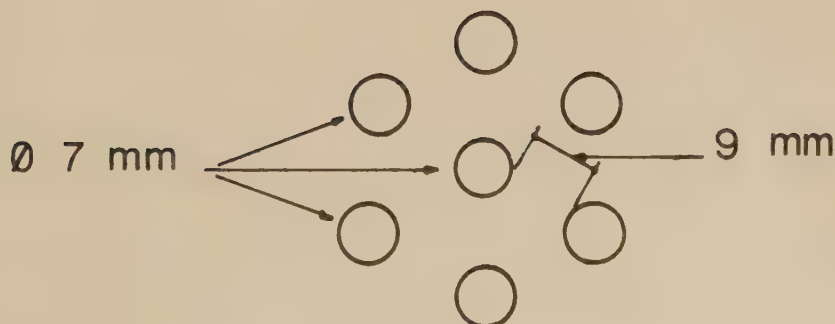
L'analyse immunologique par double diffusion sur plaque gelifiée a été faite selon la méthode d'OUCHTERLONY (1962). Pour la durée de diffusion, la composition et l'épaisseur du gel, le procédé de lavage, séchage et

coloration, comme décrit sous 7.1.

Dans les essais préliminaires, pour arriver à obtenir un pouvoir de résolution optimal, où les proportions exigées pour l'apparition des précipitations étaient réalisées en nombre maximum, nous avons employé différentes dispositions et grandeurs de puits en faisant varier aussi en même temps la quantité des deux éléments antigène et anticorps.

Après ces tests préliminaires, pour la suite de notre investigation, on a pu standardiser notre méthode avec les données suivantes:

- Distance entre puits 9 mm.
- Diamètre de chaque puits 7 mm.
- Sérum employé, quantité par puits 50 μ l.
- Antigènes, 50 μ l.
- Le sérum placé au centre et les antigènes dans les puits périphériques avec la disposition géométrique suivante:



7.3 Test d'absorption

L'épuisement du sérum par les antigènes hétérologues est réalisé par la méthode de BJORKLUND (1952).

L'immunsérum est placé dans le puits central, respectivement dans les rigoles pour l'A.I.E., avec un excès d'extrait antigénique de façon à faire précipiter in situ tous les anticorps homologues.

8. ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE

La méthode originale d'ORNSTEIN (1964) et DAVIS (1964) a été appliquée avec un appareil Buchler conçu pour l'électrophorèse en gel vertical. Les colonnes employées avaient 4,5 mm de diamètre et 20 cm. de longueur. La concentration du gel de séparation en acrylamide (Kodak) était de 7,5% et de 0,2% en N,N'-méthylène bisacrylamide (Eastman-Kodak).

Les trois phases de notre électrophorèse étaient ainsi composées et caractérisées:

- Les cuves à électrodes étaient remplies avec du tampon borate pH 8.4 (tétraborate disodique 18,65 g; acide borique 15,14 g, H₂O bidistillée ad 2.000 ml).
- Le gel supérieur "sammel-gel" pH 6,8, préparé dans du tampon Tris-H₃PO₄ , 0.1 M.
- Le gel de séparation "trenn-gel" pH 8.9, préparé dans du tampon Tris-HCl , 0.5 M.

Sur le gel supérieur on a déposé des aliquotes de 25 μ l à 50 μ l d'extrait à analyses mélangées au préalable avec du saccharose en solution finale de 10%.

La séparation électrophorétique des protéines a été obtenue avec une différence de potentiel de 180 volts et une intensité de courant de 4 mAmp. par gel, pendant 4 heures. Le front de migration a été repéré au bleu de bromophénol. La fixation et la mise en évidence des protéines totales, a été faite par l'amidoschwarz 10B (Bayer) 1% en solution acétique 5%. Pour

l'évaluation des résultats nous avons défini la position relative de chaque protéine par rapport à la distance parcourue par le marqueur au bleu de bromophénol.

9. MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE APRES IMMUNO-ELECTROPHORESE

Pour le procédé de caractérisation de complexes enzymes-antienzymes après immunoélectrophorèse, en agarose, nous nous sommes référés aux méthodes mises au point par URIEL (1963) et AVRAMEAS (communication personnelle, 1969). On a effectué les colorations enzymatiques sur des lames séchées selon la technique habituelle décrite plus haut, voir Matériel et méthodes No 7 (coloration des protéines globales). D'une manière générale, l'activité enzymatique peut être mise en évidence en incubant la lame dans une solution du substrat de l'enzyme, additionnée du coenzyme et d'un tampon convenable.

Dans notre investigation, on s'est occupé seulement d'enzymes catalysant des réactions d'oxydoréductions et plus exactement de déshydrogénases qui catalysent en présence de NAD (ou parfois NADP), le transfert d'atomes d'hydrogène d'un donneur spécifique sur un accepteur non spécifique différent de l'oxygène moléculaire en l'occurrence un sel de tétrazolium. Ce dernier est réduit en formazan coloré et insoluble au niveau du complexe enzyme-antienzyme.

L'activité enzymatique de la malate déshydrogénase a été mise en évidence en incubant les lames, pendant 60 minutes à 37° C, dans une solution de substrat, acide l-malique (grade A, Calbiochem) à la concentration de 0,01 M dans du tampon glycine pH 8,5, 0,1 M. La même solution était additionnée de Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide (Sigma) comme coenzyme, de méta-sulfate de phénazine (Sigma) et de nitro-blue de

tétrazolium (British Drug Houses, LTD).

Pour établir la spécificité de la réaction enzymatique, des lames témoins ont été incubées aux mêmes conditions dans une solution ne contenant pas de substrat.

III. R E S U L T A T S

1. ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SOLUBLES DU TYPE SAUVAGE DE NEUROSPORA CRASSA COMPAREE A CELLE DE DEUX DE SES MUTANTS MORPHOLOGIQUES.

Pour cette première partie de notre investigation, nous nous sommes proposés de rechercher dans la fraction soluble des différences chimiques produites par les gènes mutés, et vraisemblablement inductrices des modifications morphologiques observées chez les deux mutants "fl" et "amyc" (Tableau 1 et Photo 1).

Dans ce but, on a employé:

- les souches Nc, "fl" et "amyc"
- le milieu Ps
- les méthodes décrites sous II, 3 à 9.

1.1 E l e c t r o p h o r è s e e n g e l d e p o l y a c r y l a m i d e

Avec cette méthode, nous avons comparé les fractions protéiniques extraites des trois souches considérées.

1.1.1 Essais préliminaires

De nombreux essais de séparation électrophorétique à différentes concentrations en gel de polyacrylamide ont été faits. Ayant obtenu les meilleurs

PHOTO 1. Aspect macroscopique des cultures des trois souches.

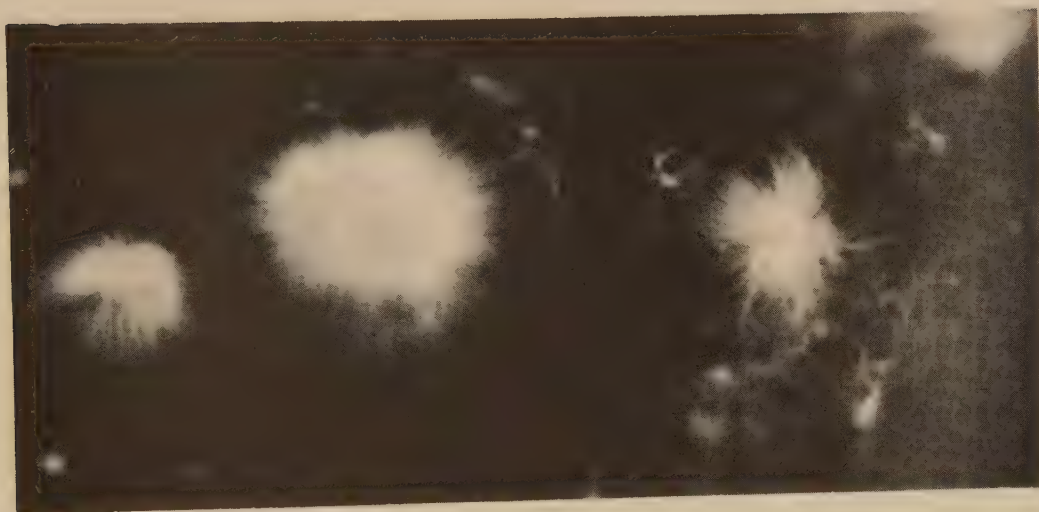
1a. Culture de Nc âgée de 96 heures.

1b. Culture de "fl" âgée de 96 heures.

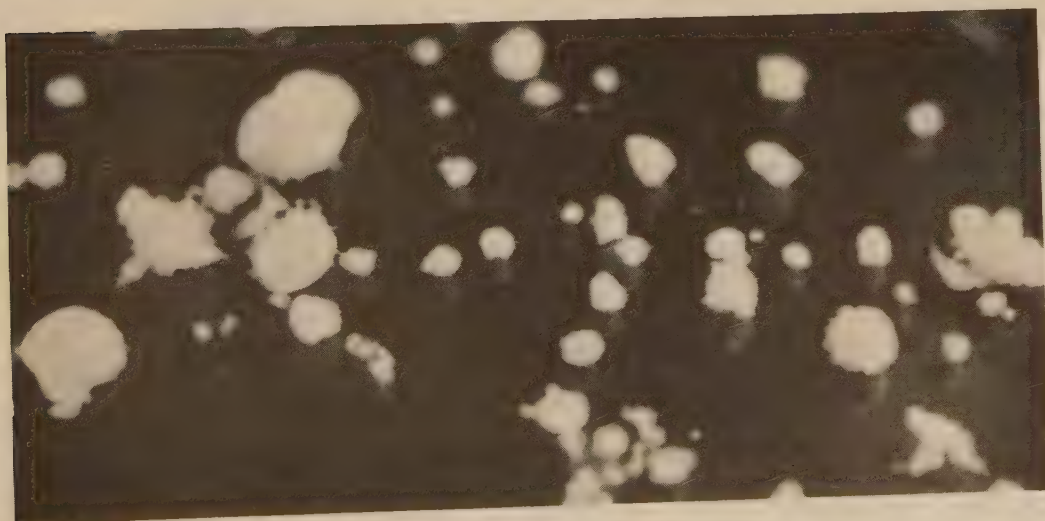
1c. Culture de "amyc" âgée de 96 heures.



1a



1b



1c

fractionnements avec une concentration en acrylamide de 7,5% et 0,2% de N-N-méthylène bisacrylamide, nous avons choisi pour toutes nos expériences ces concentrations.

S'agissant de l'analyse d'un homogénat brut de composition assez complexe, pour augmenter la résolution et obtenir ainsi une meilleure lecture de nos distributions électrophorétiques, nous avons augmenté la longueur de migration de 30 mm (au total 100-120 mm). A cet effet, nous avons employé le même appareil avec des gels de migration plus longs et parallèlement le temps d'électrophorèse a été augmenté.

Le gel de séparation a toujours été employé avec une alcalinité assez forte. Avec le pH 8,9 normalement utilisé, toutes les fractions protéiniques des extraits examinés ont montré une dissociation acide avec migration vers l'anode. En effet, aucun composant ne pouvait être révélé avec l'amidoschwarz par le même système de gel et le courant électrique à polarité renversée.

1.1.2 Dénombrement des fractions et estimation des similarités

Pour chaque souche, on a pu établir un protéinogramme caractéristique et reproductible qui n'a pu être standardisé qu'à la suite de plusieurs séparations électrophorétiques.

Tous les électrophorégrammes ont été établis sur la base du calcul du Rp (rapport proportionnel) défini comme la position relative de chaque protéine par rapport à la distance maximum fixée à

1'000 parcourue par le marqueur au bleu de bromophénol.

Les différences ainsi que le degré de corrélation entre les bandes peuvent être considérés comme significatifs du fait que, préalablement à l'électrophorèse, on a ajusté les extraits au même titre de protéines.

Cet ajustement de la concentration en protéines a été réalisé à la suite du dosage selon LOWRY et coll. (1951) dans le but d'établir des comparaisons qualitatives valables entre souches. Leur différence de composition en protéines est donnée par les images électrophorétiques schématisées dans le tableau 2.

Ce tableau, établi selon le même principe du Rp, nous donne les différences de mobilité, de nombre et de répartition des fractions de la souche sauvage considérée par rapport aux deux souches mutantes et les différences entre les deux mutants.

L'amidoschwarz nous a permis de colorer et de distinguer, comme protéines solubles des trois souches, avec des degrés plus ou moins intenses mais suffisants de coloration, le nombre de bandes suivant:

29 bandes pour la souche sauvage, en comptant les bandes G_1 , H_1 et R_1 comme dédoublement diffus de G, H et R. Les deux dédoublements ont été repérés aux Rp respectifs de 0'303, 0'340 et 0'670.

23 bandes pour la souche mutante "amyc", en comptant la bande R_1 , bien plus marquée que chez le type sauvage, et H_1 , aussi diffuse que chez le sauvage.

26 bandes pour la souche mutante "fl".

En outre, le même tableau 2, nous permet le calcul de similarité entre souches par la formule proposée par WHITNEY et coll. (1968).

Formule permettant la comparaison entre les différents rapports proportionnels (Rp) :

$$\frac{\text{Nombre de paires de bandes similaires}}{\text{Nombre de bandes différentes} + \text{Nombre de paires de bandes similaires}} \times 100$$

Selon cette formule on a obtenu les résultats suivants:

Similarité de 44,7% entre Nc et "fl"

Similarité de 47,1% entre Nc et "amyc"

Similarité de 48,4% entre "amyc" et "fl"

Ces résultats nous permettent de considérer le mutant "amyc" comme plus proche du type sauvage que le mutant "fl".

Cette plus grande similarité entre le mutant "amyc" et le type sauvage peut s'expliquer par

le fait que la mutation morphologique consiste en une non-scission de la paroi (aschizogénie) (DICKER et coll., 1969), empêchant la libération des conidies. Par contre, chez le mutant "fl", la formation même des macroconidies est supprimée.

1.1.3 Estimation quantitative comparée

Il pouvait être intéressant de comparer les intensités de coloration des protéines séparées en gel et extraites au préalable à partir de quantités comparables de matériel sec.

Pour cela nous avons solubilisé, toujours avec la même proportion de 1 à 10 (poids/volume), une aliquote de mycélium lyophilisé égale pour les trois souches de Neurospora, dans un même volume de tampon phosphate.

Avec cette méthode, une autre dissemblance entre les trois souches a pu être observée fondée sur l'intensité de coloration des gels à l'amidoschwarz. Les différences quantitatives assez importantes dans le spectre protéinique, qui ont été ainsi obtenues, peuvent être considérées comme l'indication que les protéines extractibles par unité de poids de mycélium lyophilisé varient pour les trois souches (voir photo No 2).

PHOTO 2. Fractionnement des protéines obtenu en gel de polyacrylamide pour les trois souches Nc, "fl" et "amyc" (de gauche à droite).

Noter la différence d'intensité de coloration.

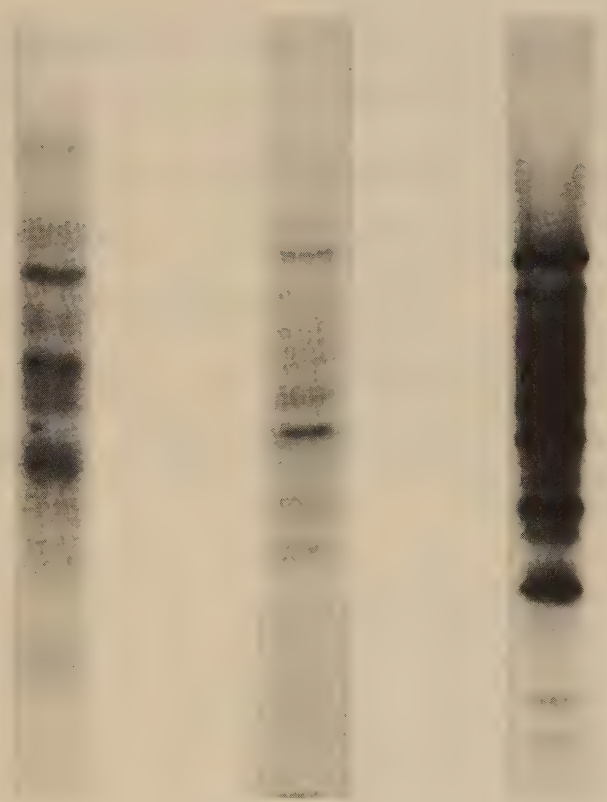


TABLEAU 2

COMPARAISON DES DIAGRAMMES ELECTROPHORETIQUES EN GEL
D'ACRYLAMIDE POUR LES SOUCHES Nc, "fl" ET "amyc".

Chaque diagramme des protéines est établi sur la base de leur Rp (rapport proportionnel) défini comme position relative de chaque protéine par rapport à la distance maximum de 1000 parcourue par le marqueur au bleu de bromophénol.

C_{Nc} = code établi pour le protéinogramme du type sauvage de N. crassa.

C _{Nc}	Rp	Nc	fl	amyc
A	0030			
	0080			
B	0095			
C	0105			
	0117			
	0130			
D	0147			
E	0201			
	0220			
F	0238			
G	0280			
G ₁	0301			
H	0328			
H ₁	0340			
	0360			
I	0380			
	0400			
J	0432			
K	0465			
L	0480			
M	0500			
N	0515			
O	0527			
P	0555			
	0570			
	0590			
Q	0620			
R	0640			
R ₁	0670			
	0690			
S	0708			
T	0725			
U	0760			
V	0780			
W	0805			
	0839			
	0845			
X	0860			
Y	0885			
Z	0930			
	1000			

1.2. I m m u n o c h i m i e

Il s'agit dans cette partie d'une étude comparée de la structure antigénique des protéines solubles endocellulaires déjà examinées par électrophorèse en gel de polyacrylamide au paragraphe 1.1. des résultats.

Pour la caractérisation de mélanges complexes de protéines, les méthodes immunochimiques présentent l'avantage d'une grande spécificité, bien qu'elles s'adressent uniquement aux fractions ayant une activité antigénique.

Les expérimentations visant à dénombrer et comparer les protéines antigéniques des trois organismes: Nc, "fl" et "amyc" ont été entreprises avec les techniques suivantes:

1.2.1. Double diffusion simple.

1.2.2. Immunoélectrophorèse.

1.2.3. Immunodiffusion en gel d'agar après électrophorèse en gel de polyacrylamide.

1.2.1. D o u b l e d i f f u s i o n s i m p l e

1.2.1.1. Spécificité des anticorps

Le premier test d'immunodiffusion qui nous a semblé indispensable a été le contrôle de la spécificité des anticorps contenus dans les immunsérums, pour le matériel biologique injecté aux lapins.

Sur des plaques d'agar témoins, nous avons laissé diffuser les homogénats des trois souches contre les sérums des lapins prélevés avant la première injection d'immunisation. Aucune précipitation n'a été obtenue.

Le résultat négatif de ce test est très important, car il prouve que dans les sérums des lapins il n'y avait aucun anticorps capable de faire précipiter des fractions antigéniques de nos extraits, ce qui aurait dû être considéré comme une réaction non-caractéristique. Nous avons ainsi la garantie que toutes les réactions de précipitation obtenues avec les immunsérums dans notre investigation sont bien dues aux anticorps spécifiques produits contre les macromolécules antigéniques solubles des trois souches.

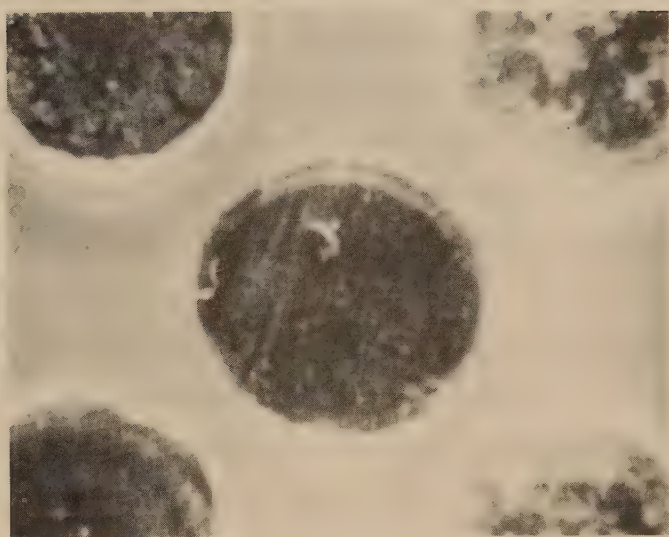
Le test parallèle, avec la même disposition des antigènes et des sérums de lapins prélevés après la troisième piqûre d'immunisation, a donné un nombre très important d'arcs de précipitation.

Dans les photos 3a et 3b nous avons comparé ces tests parallèles.

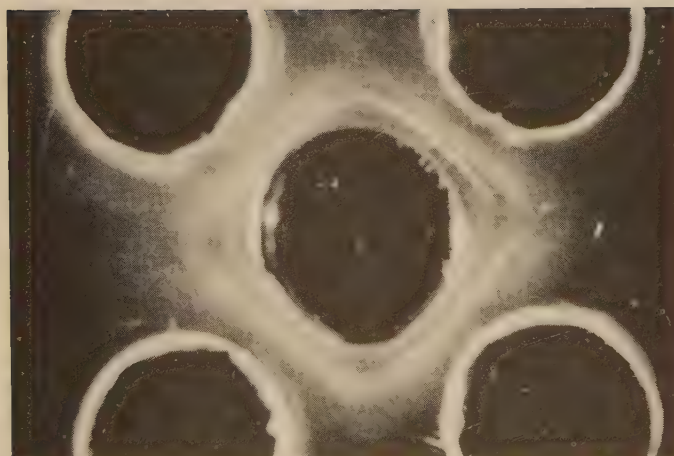
PHOTO 3. Test de double diffusion, spécificité des anticorps.

3a. Au centre: sérum de préimmunisation
(Noter l'absence de fractions précipitantes).

3b. Au centre: immunsérum anti-sauvage.



3a



3b

1.2.1.2. Dénaturation thermique.

Le test de la thermolabilité a été réalisé comme première caractérisation chimique de notre mosaïque antigénique. Ce procédé peut être mis en relation avec la sérologie grâce au principe suivant:

les protéines à la température de 60° C sont dénaturées et perdent, par conséquent, leurs propriétés antigéniques, tandis que les glucoprotéines maintiennent leur intégrité et restent antigéniquement actives.

Le même principe est valable pour les antigènes d'origine polysaccharidique ou lipidique. Pour prouver la nature protéinique de nos antigènes précipitants, les homogénats ont donc été chauffés pendant 20 minutes dans un bain-marie thermostatisé à 60° C avant l'immunodiffusion.

Après ce traitement par diffusion contre les immun-sérums aussi bien homologues qu'hétérologues, nos homogénats n'ont plus révélé d'arcs de précipitation. La photo 4 montre une plaque avec l'immunsérum anti-Nc dans le puits central. Dans les puits externes, nous avons placé les 3 extraits (de gauche à droite Nc, "fl" et "amyc") non chauffés en haut et chauffés en bas.

Dans la moitié supérieure de la plaque, les arcs de précipitation sont observables en grand nombre. Dans la moitié inférieure, il n'y a aucune réaction. La température exclut toute réaction résiduelle; ceci est montré par l'absence complète de continuité des arcs révélés dans la partie supérieure.

Ce test positif de la dénaturation thermique de nos antigènes, démontré par la disparition totale des arcs de précipitation, nous permet d'exclure l'existence

de fractions antigéniques de nature glucoprotéinique ou polysaccharidique dans nos homogénats. pour cette même raison, et sachant que les antigènes des parois cellulaires sont de nature glucoprotéinique et polysaccharidique, nous pouvons affirmer que nous avons travaillé avec la fraction endocellulaire cytoplasmique non contaminée (MÜLLER et HIRSCH, 1967).

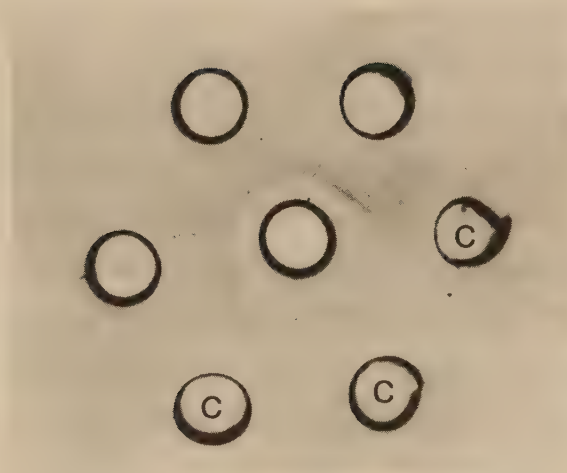


PHOTO 4. Immunodiffusion des antigènes chauffés.

En C : les antigènes chauffés.

1.2.1.3. Réactions préliminaires

Le fait de posséder trois sérums différents nous permettait de tenter une analyse comparative très détaillée. On sait en effet que l'information obtenue par des précipitations contre un seul type d'immunsérum est limitée (OUCHTERLONY, 1962).

Il était dès lors nécessaire d'entreprendre une série d'investigations destinées à établir si les immunsérums avaient la même teneur en anticorps, cela afin d'obtenir, dans les réactions croisées, des diagrammes comparables.

Différentes dispositions géométriques des puits, avec, parallèlement plusieurs dilutions des sérums et des antigènes, ont été employées dans ce but. Grâce à la variation des distances entre les puits et, en plus, de la variation des concentrations des deux éléments, antigènes et anticorps, il nous a été possible de déterminer les proportions convenables pour l'obtention des précipités.

En effet, on sait que si un rapport adéquat des deux concentrations n'est pas réalisé, il peut y avoir absence de précipitation par insuffisance quantitative ou par excès d'un des deux éléments, auquel cas la redissolution d'une éventuelle précipitation est toujours possible.

1.2.1.4. Réactions homologues et réactions hétérologues

Les réactions homologues, pour les trois souches, ont donné un nombre d'arcs de précipitation variant entre 6 et 8. Le faible pouvoir de résolution de cette méthode ne nous a pas permis de distinguer un nombre supérieur de fractions précipitantes, mais nous pouvons supposer que les précipitations très marquées observées sont dues à plusieurs réactions différentes, localisées au même niveau.

Les réactions croisées ont mis en évidence l'identité de 6 composants antigéniques dans l'homogénat de Nc et dans celui du mutant "amyc".

Dans les antigènes de Nc, un composant (R) ne trouve aucune continuité avec les arcs de précipitation des antigènes d'"amyc" et de "fl" (Planche 1, fig. a; photo 5).

Par contre, l'homogénat du mutant "amyc" contient une fraction antigénique supplémentaire (A) qui n'est pas décelable parmi les antigènes de Nc et de "fl" (Planche 1, fig. b; photo 6).

Parmi les précipitations globales de l'homogénat de "fl", il est très difficile d'observer des fractions particulières se détachant nettement des spectres hétérologues. (Planche 1, fig. c; photo 7).

PLANCHE 1 - PHOTOS 5, 6 ET 7

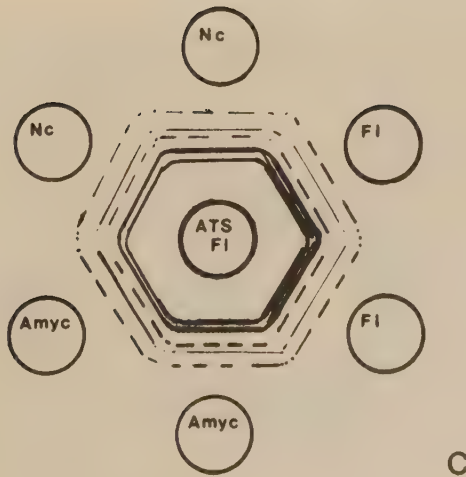
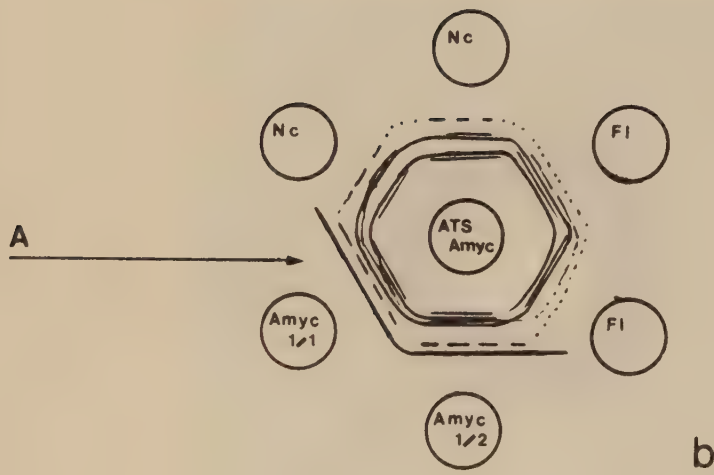
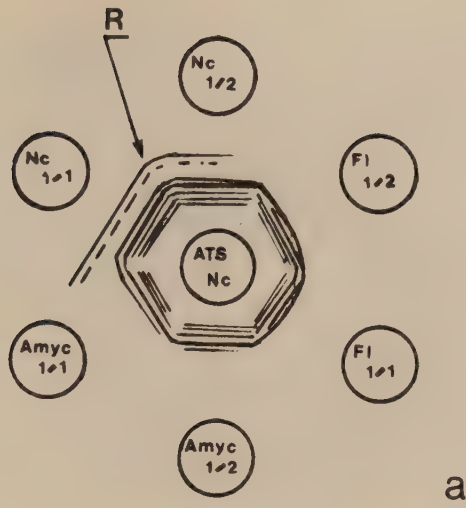
REACTIONS CROISEES EN DOUBLE DIFFUSION

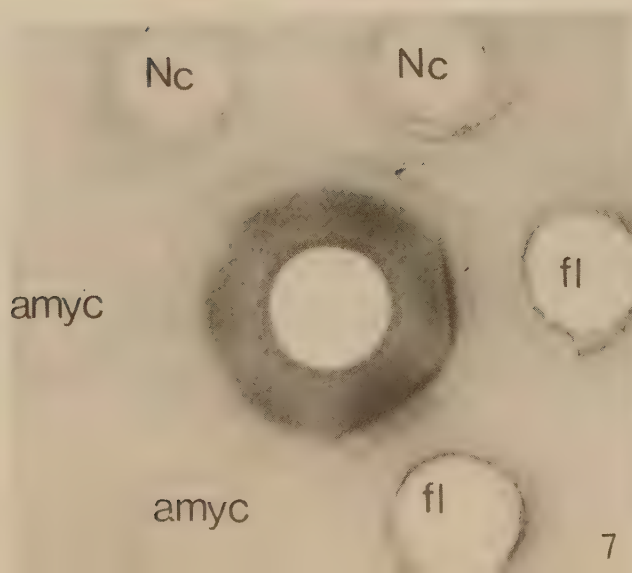
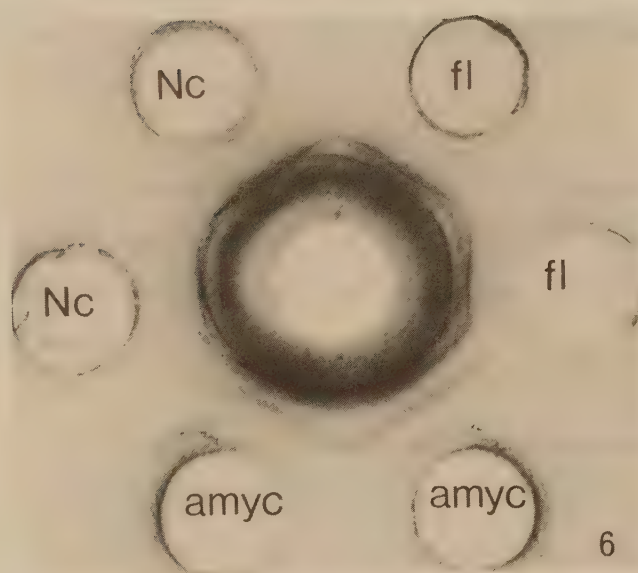
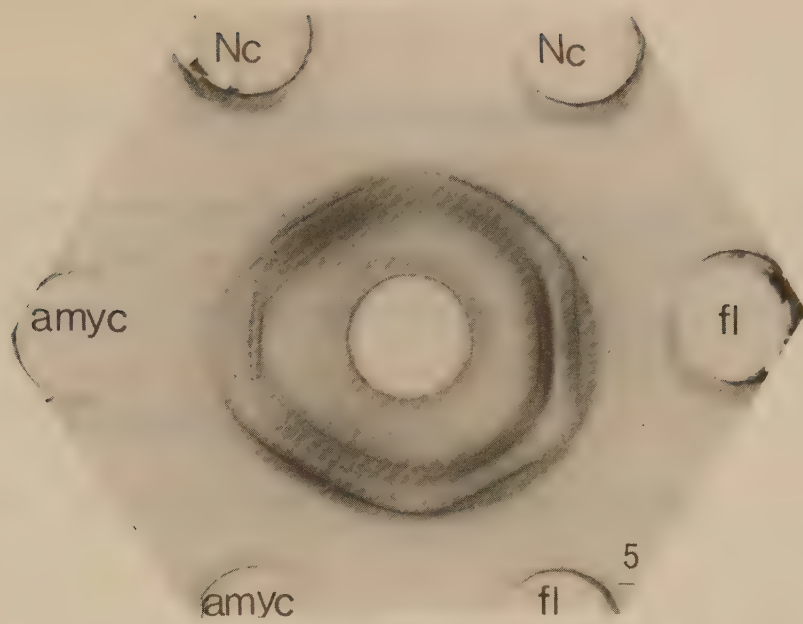
La disposition et la dilution des antigènes est la même pour les trois lames. Dans les puits centraux les immunsérums ont été déposés comme suit:

fig. a; photo 5. Immunsérum anti-Nc.

fig. b; ,photo 6. Immunsérum anti-"amyc".

fig. c; photo 7. Immunsérum anti-"fl".





1.2.1.5. Réactions d'absorption

La saturation des immunsérums, selon la technique de Björklund, nous a permis d'isoler les composants différentiels déjà observés partiellement sous 1.2.1.4.

A. Réactions homologues

a) Absorption de l'immunsérum anti-Nc

Avec la même disposition géométrique de la plaque, nous avons laissé diffuser à partir du puits central l'immunsérum anti-Nc en présence d'un excès de protéines antigéniques hétérologues extraites des mutants "fl" et "amyc".

Lors de la première réaction, épuisement de l'immunsérum par l'homogénat de "fl", il ne subsiste qu'un seul arc de précipitation avec un halo diffus (planche 2, fig. a).

Lors de la deuxième réaction, épuisement de l'immunsérum anti-Nc par l'homogénat d'"amyc", il ne subsiste qu'un seul arc de précipitation net (planche 2, fig. b).

b) Absorption de l'immunsérum anti-"fl"

Les réactions analogues d'inhibition de l'immunsérum anti-"fl" par des solutions antigéniques hétérologues de Nc et d'"amyc" n'ont donné aucun arc de précipitation net. Les halos diffus observables nous laissent supposer que la souche "fl" possède des protéines spécifiques avec des propriétés antigéniques

et, en effet, l'analyse immunoélectrophorétique, beaucoup plus fine, nous indique cette existence de composants spécifiques (cf. résultats 1.2.2.4.).

c) Absorption de l'immunsérum anti-"amyc"

Pour les réactions réalisées avec l'immunsérum anti-"amyc" épuisé par les antigènes des souches Nc et "fl", voir planche 3, fig. a et fig. b.

L'immunsérum d'"amyc" après absorption par les antigènes de "fl" révèle encore, par diffusion contre son homogénat, une fraction précipitante très nette avec un dédoublement et un halo diffus (planche 3, fig. a).

L'isolement de l'arc de précipitation spécifique du mutant "amyc" par rapport au sauvage (planche 3, fig. b) est examiné au paragraphe 1.2.3. des résultats.

B. Réactions hétérologues

Les réactions hétérologues après saturation préalable des anticorps des immunsérums viennent compléter les données sur la spécificité des fractions isolées décrites ci-dessus. De plus, si aucune fraction n'est révélée lorsqu'on oppose l'antisérum absorbé au même antigène hétérologue absorbant, il faut admettre que la saturation est complète.

a) Absorption de l'immunsérum anti-Nc

La réaction croisée entre l'immunsérum anti-Nc absorbé

par les antigènes de "fl" diffusant contre les antigènes hétérologues d'"amyc", donne un arc de précipitation.

Par contre, le halo diffus qui accompagnait la même fraction dans la réaction homologue disparaît. (planche 3a, fig. a; photo 8).

Lors de la réaction croisée avec l'immunsérum anti-Nc épuisé par les antigènes d'"amyc" et les antigènes de "fl", aucune réaction ne subsiste.

b) Absorption de l'immunsérum anti-"fl"

Les réactions hétérologues effectuées avec l'immunsérum anti-"fl" absorbé, soit par les antigènes Nc, soit par les "amyc", n'ont donné aucune précipitation.

c) Absorption de l'immunsérum anti-"amyc"

L'immunsérum anti-"amyc" épuisé par les antigènes de "fl" développe contre les antigènes de Nc un arc de précipitation; de plus le dédoublement et le halo diffus de la réaction homologue disparaissent (planche 3a, fig. b; photo 9). Par contre, toute précipitation disparaît dans la réaction hétérologue faite avec l'immunsérum anti-"amyc" - absorbé par les antigènes Nc - et les antigènes de "fl".

En ce qui concerne la spécificité des fractions isolées par absorption, les données des expériences ci-dessus nous ont permis de dresser le tableau 3.

PLANCHE 2 - IMMUNODIFFUSION

REACTIONS HOMOLOGUES AVEC L'IMMUNSERUM ANTI-Nc
ABSORBE

fig. a. Au centre: immunsérum anti-Nc épuisé par
les antigènes de "fl".

Dans les puits externes: extrait antigénique
de Nc à différentes dilutions
(de 1/1 jusqu'à 1/16).

fig. b. Au centre: immunsérum anti-Nc épuisé par
les antigènes d'"amyc".

Dans les puits externes: extrait antigénique
de Nc à différentes dilutions
(de 1/1 jusqu'à 1/16).

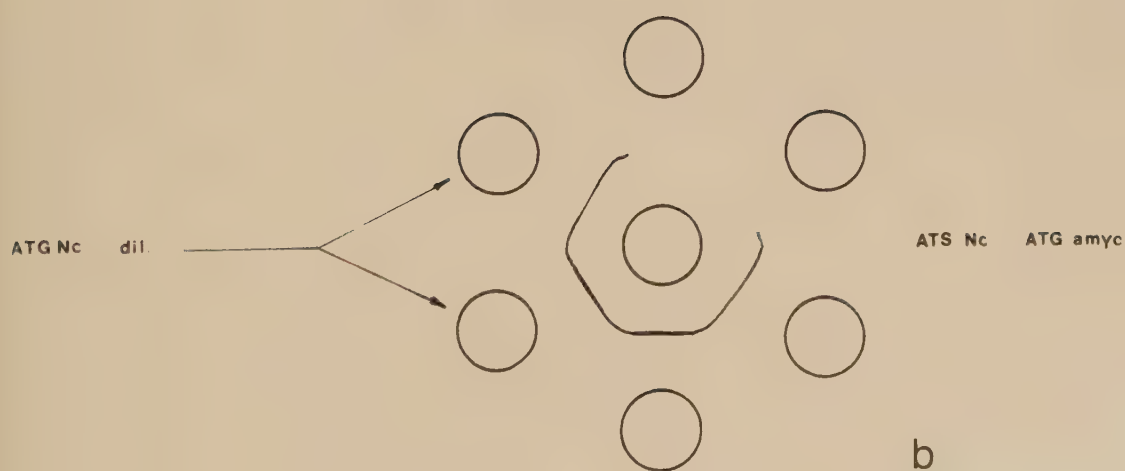
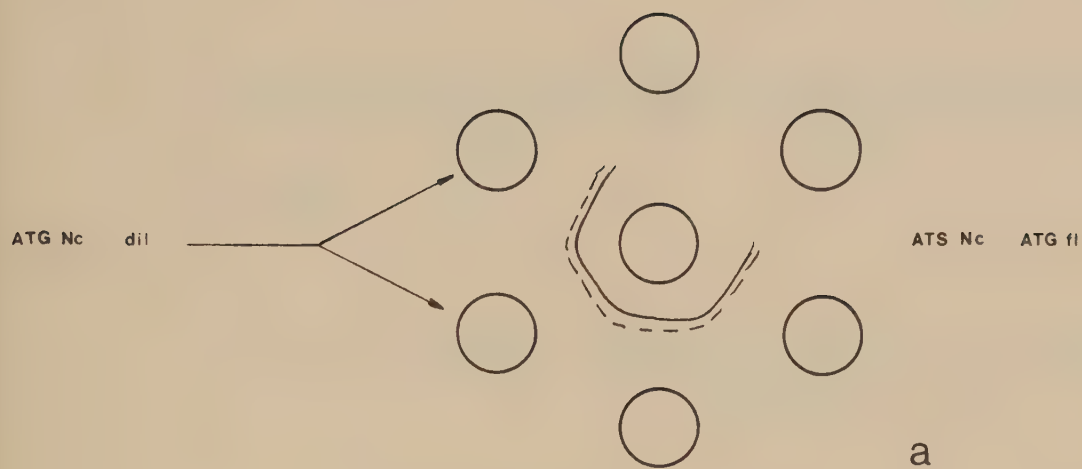


PLANCHE 3 - IMMUNODIFFUSION

REACTIONS HOMOLOGUES AVEC L'IMMUNSERUM ANTI-"amyc"

ABSORBE

fig. a. Au centre: immunsérum anti-"amyc" épuisé par
les antigènes de "fl".

Dans les puits externes: extrait antigénique
d'"amyc" à différentes dilutions
(de 1/1 jusqu'à 1/16).

fig. b. Au centre: immunsérum anti-"amyc" épuisé par
les antigènes de Nc.

Dans les puits externes: extrait antigénique
d'"amyc" à différentes dilutions
(de 1/1 jusqu'à 1/16).

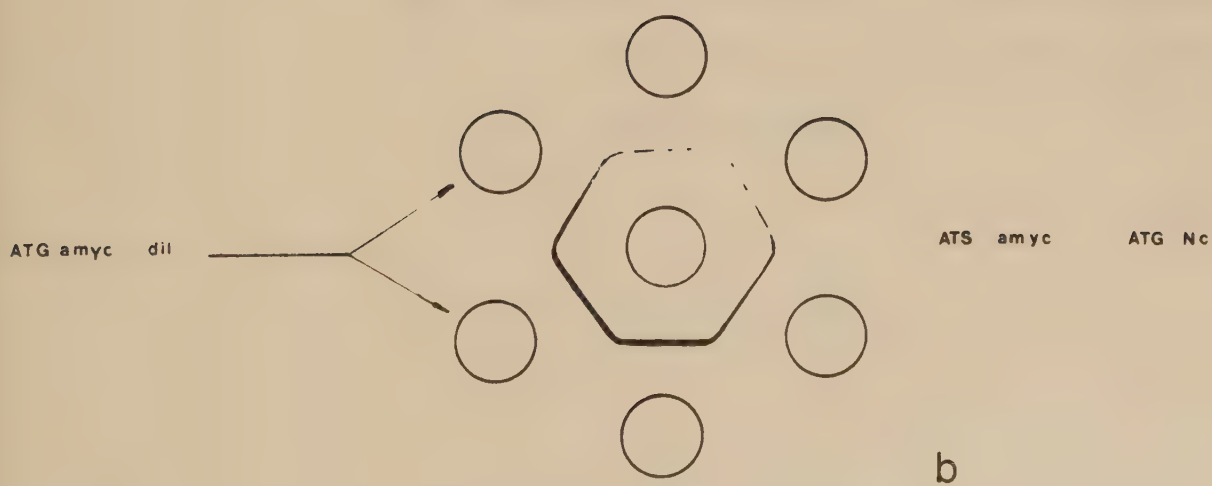
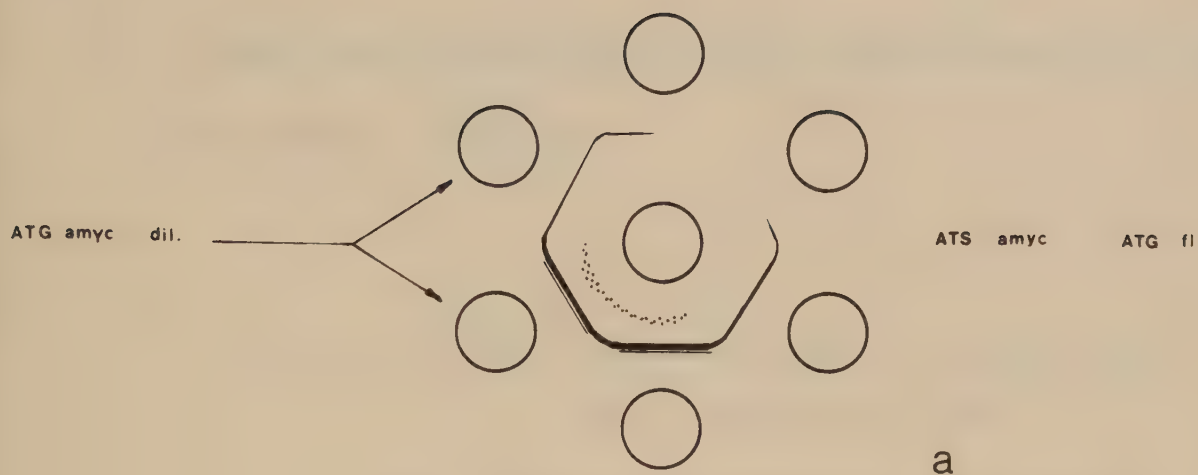


PLANCHE 3a - IMMUNODIFFUSION

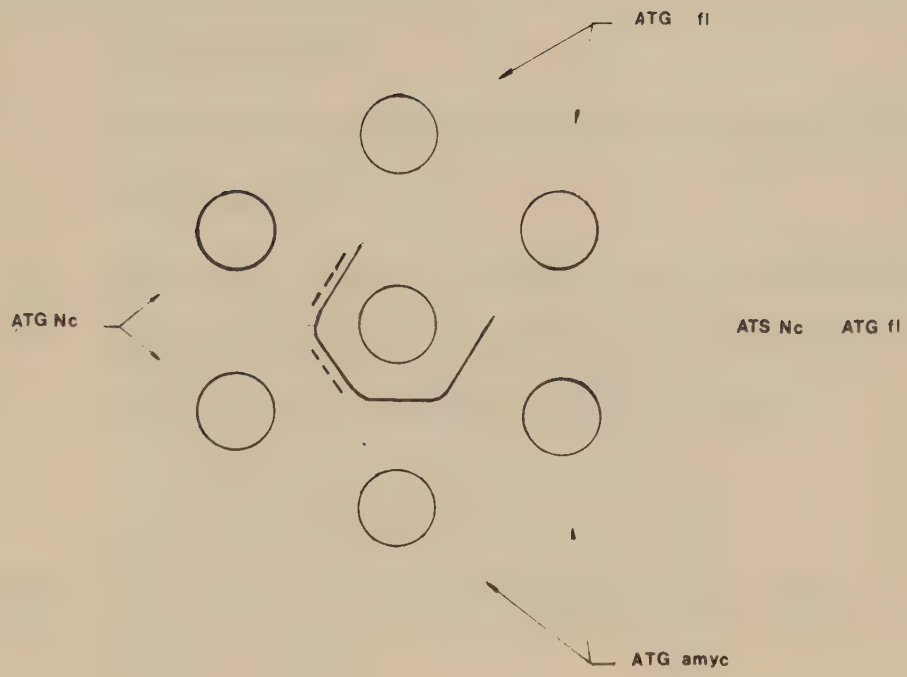
REACTIONS HETEROLOGUES AVEC LES IMMUNSERUMS ANTI-"amyc"
ET ANTI-Nc ABSORBES

fig. a. Au centre: immunsérum anti-Nc épuisé par
les antigènes de "fl".

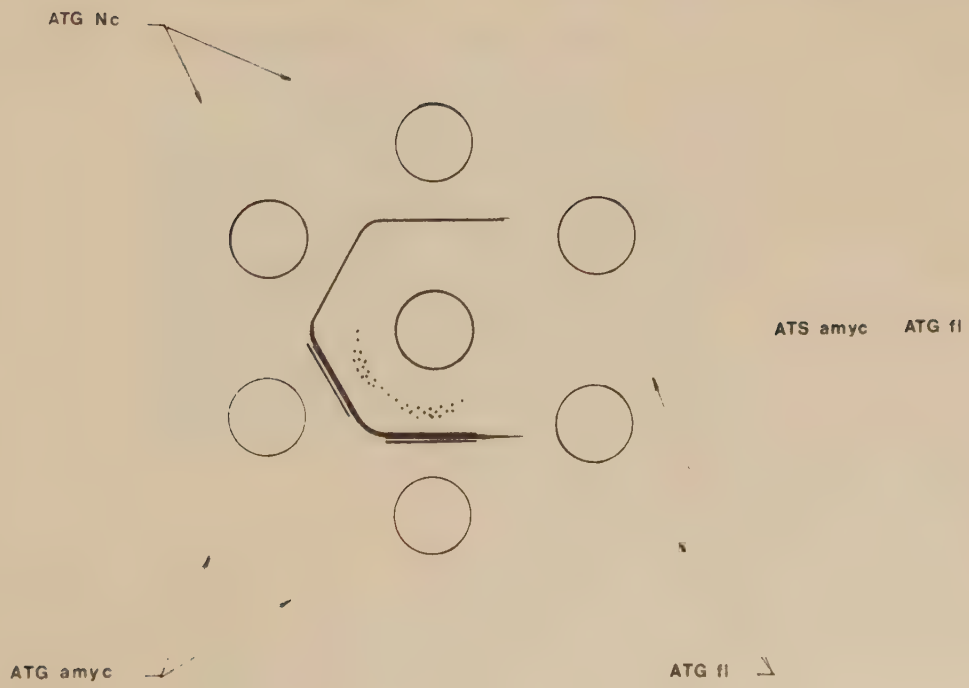
Dans les puits externes: les trois anti-
gènes "fl", "amyc" et Nc comme
disposé dans le schéma.

fig. b. Au centre: immunsérum anti-"amyc" épuisé par
les antigènes de "fl".

Dans les puits externes: les trois antigènes
"fl", "amyc" et Nc comme disposé
dans le schéma.



a



b

PHOTO 8. Double diffusion, plaque d'absorption, réaction hétérologue.

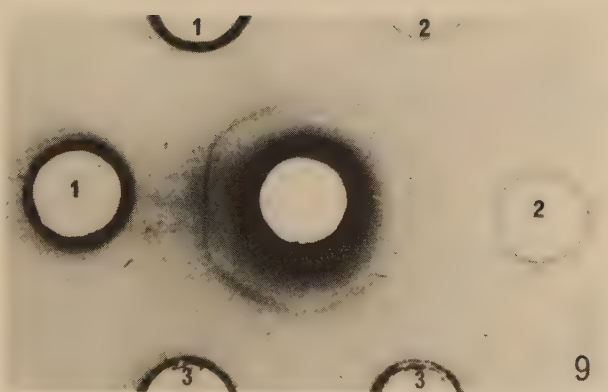
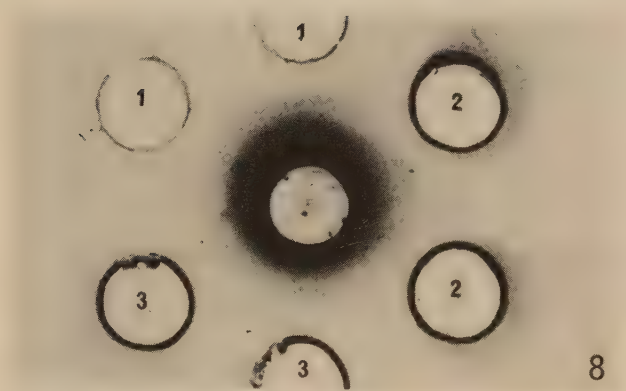
Au centre: immunsérum anti-Nc épuisé par les antigènes de "fl".

Dans les puits externes: en 1, extrait antigénique de Nc; en 2, extrait antigénique de "fl"; en 3, extrait antigénique d'"amyc".

PHOTO 9. Double diffusion, plaque d'absorption, réaction hétérologue.

Au centre: immunsérum anti-"amyc" épuisé par les antigènes de "fl".

Dans les puits externes: même disposition des antigènes que sous photo 8.



TABEAU 3

REACTIONS HOMOLOGUES ET HETEROLOGUES EN DOUBLE DIFFUSION AVEC LES IMMUNISERUMS ABSORBES

Nombre de fractions antigéniques révélées par les trois immunisérums absorbés.

ANTIGENES	IMMUNISERUMS ABSORBES					
	ATS Nc + ATG "fl"	ATS Nc + ATG "amyc"	ATS "fl" + ATG Nc	ATS "fl" + ATG "amyc"	ATS "amyc" + ATG Nc	ATS "amyc" + ATG "fl"
ATG Nc	2	1	-	-	-	1
ATG "fl"	-	-	halo diffus	halo diffus	-	-
ATG "amyc"	1	-	-	-	1	2-3

1.2.2. I m m u n o é l e c t r o p h o r è s e

1.2.2.1. Réactions préliminaires.

Pour l'application de ce test, il fallait trouver la mobilité électrophorétique adéquate. En effet, au départ, nous disposions d'un extrait de nature complètement inconnue et d'un appareil à électrophorèse standardisé pour des analyses de protéines sériques. Le temps de séparation électrophorétique devait nous garantir une dissociation suffisante de notre mélange antigénique, sans toutefois que ce dernier dépasse la zone d'action du sérum diffusant des rigoles latérales. La qualité de l'extrait était d'importance capitale et ne dépendait pas seulement de sa teneur en protéines, mais aussi de sa préparation extemporanée et de la qualité de cette dernière.

Nous avons dû constater que lorsque l'extrait n'était pas soumis à la phase clarifiante de congélation-décongélation, il donnait un immunoélectrophorégramme très flou et très pauvre en fractions précipitantes. Il faut en outre relever que lorsque l'antigène est un mélange complexe, comme dans le cas présent, la difficulté d'arriver à équilibrer les rapports antigènes-anticorps est très grande. En considérant ce problème et dans le but de trouver une zone d'équivalence très large, nous avons envisagé une série de réactions avec différentes doses d'immunsérums.

Les meilleurs diagrammes ont été obtenus par révélation des antigènes avec 50 microlitres de sérum.

1.2.2.2. Réactions homologues.

Le mélange d'antigènes, après séparation électrophorétique, est opposé à l'antisérum homologue. Ces réactions nous donnent la structure antigénique propre à chacune des trois souches étudiées.

- a) L'immunoélectrophorèse de la souche sauvage réalisée avec l'immunsérum homologue anti-Nc, révèle, à l'examen détaillé, 15 arcs de précipitation. Dans la planche 4, le dénombrement des arcs est fait en partant de la précipitation anodique extrême. La photo 10 donne la même visualisation des fractions antigéniques homologues par la thiazine-rot.
- b) Avec l'A.I.E. des antigènes de la souche mutante "fl" avec l'immunsérum homologue anti-"fl", nous avons pu dénombrer 13 arcs de précipitation (planche 5; photo 11).
- c) Le diagramme immunoélectrophorétique des antigènes "amyc" révélé par l'immunsérum homologue se compose de 13 systèmes précipitants (planche 6; photo 12).

Au tableau 4, nous présentons l'énumération des arcs de précipitation composant les 3 immunoélectrophorégrammes homologues.

PLANCHE 4

SCHEMA DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES
ANTIGENES DE Nc REVELES PAR L'IMMUNSERUM HOMOLOGUE.

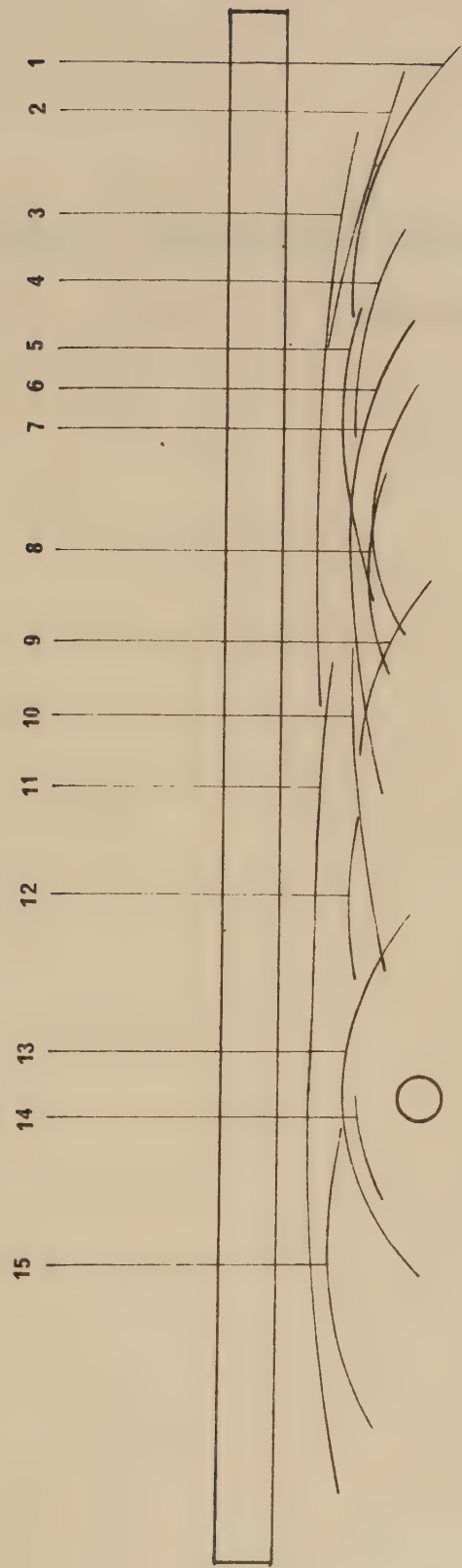
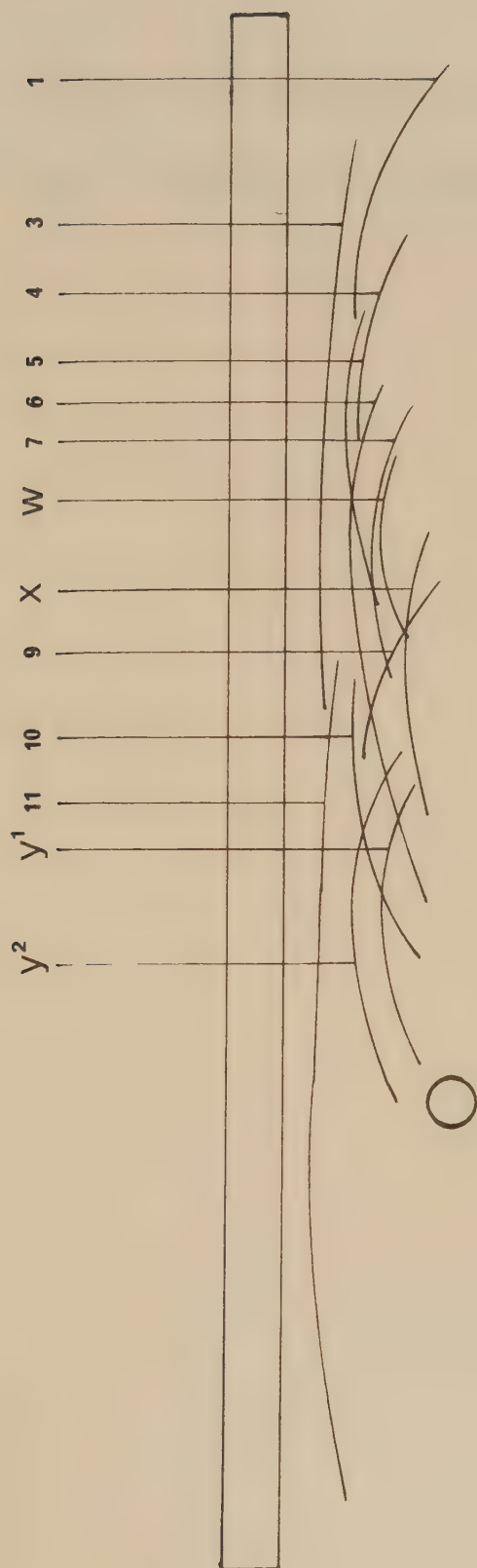


PLANCHE 5

SCHEMA DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES
ANTIGENES DE "f1" REVELES PAR L'IMMUNSERUM HOMOLOGUE



+

PLANCHE 6

SCHEMA DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES
ANTIGENES D'"amyc" REVELES PAR L'IMMUNSERUM HOMOLOGUE

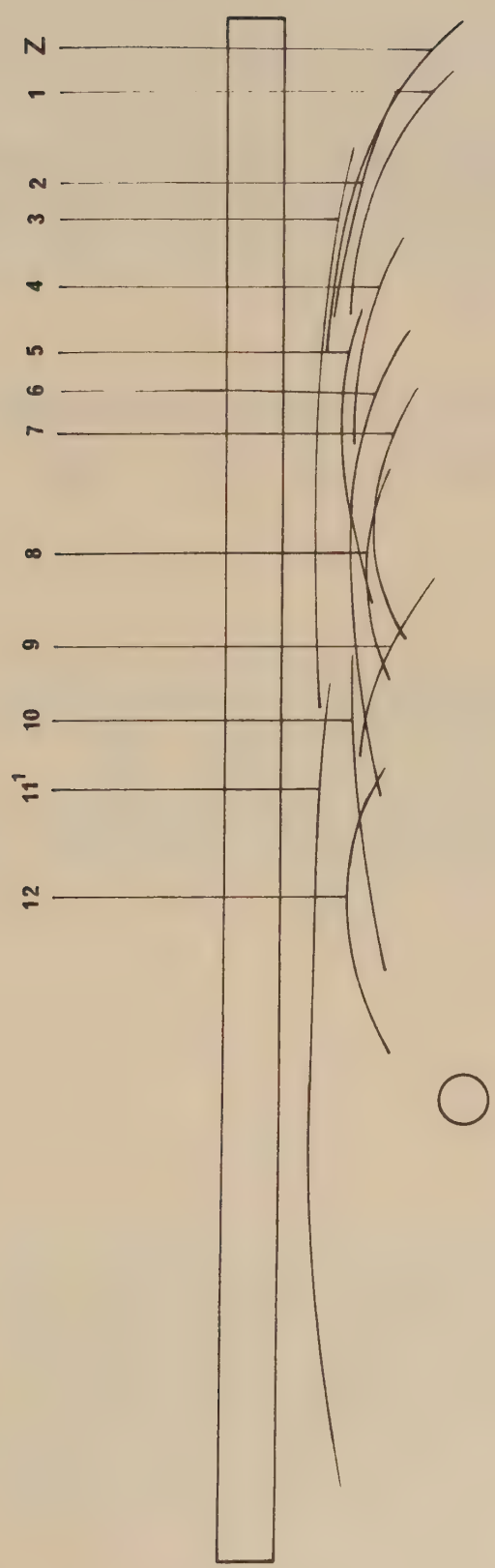
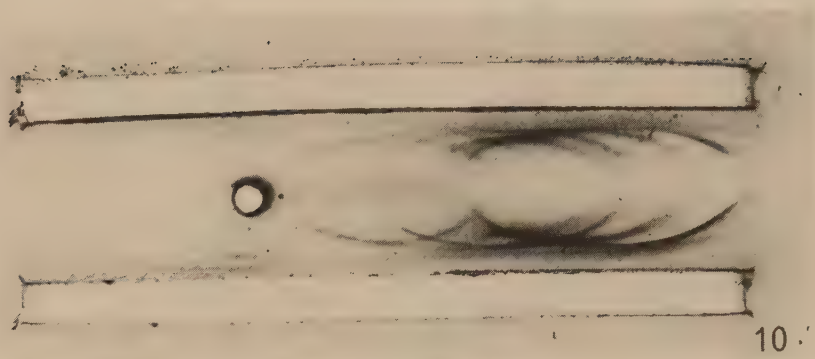


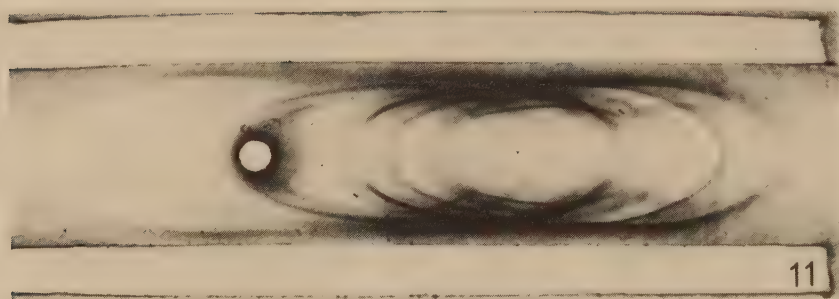
PHOTO 10. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique
de Nc révélé par son immunsérum homologue.

PHOTO 11. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique
de "fl" révélé par son immunsérum homologue.

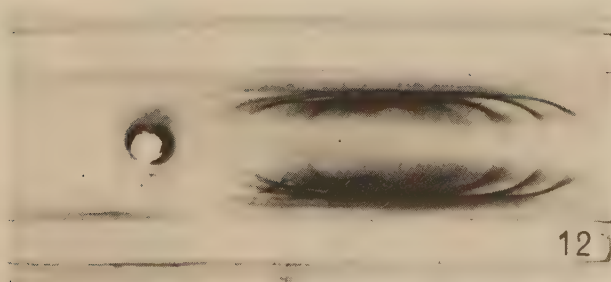
PHOTO 12. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique
d' "amyc" révélé par son immunsérum homologue.



10.



11



12]

TABLEAU 4

DENOMBREMENT DES IMMUNOPHOREGRAMMES REVELES PAR LES IMMUNISERUMS HOMOLOGUES

Structures antigéniques des 3 souches Nc, "fl" et "amyc" révélées par immunoelectrophorèse en réaction homologue.
 Le dénombrement des fractions est fait sur la base du code établi pour la souche sauvage.
 Les chiffres identiques courespondent aux fractions communes.

SOUCHES	FRACTIONS ANTIGENIQUES														
Nc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
"fl"	1		3	4	5	6	7		W	X	9	10	Y ¹	Y ²	
"amyc"	Z	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 ¹	12		

Après cette première comparaison des diagrammes globaux nous pouvons déduire les éléments suivants:

- 1.) Chaque souche possède son propre diagramme A.I.E. reproductible.
- 2.) Le diagramme A.I.E. de la souche sauvage exhibe, par rapport aux diagrammes des mutants, deux fractions très marquées à faible mobilité cathodique (arc No. 13 et arc No. 15). De plus, l'arc No. 14 est restreint et n'est pas toujours présent dans le diagramme.
- 3.) La souche mutante "fl" présente dans les fractions à mobilité anodique moyenne deux précipitations différentielles très marquées (arcs X et Y) par rapport aux deux autres souches.
L'une des fractions Y est dédoublée (Y1 et Y2).
- 4.) De même, la souche "amyc" possède une fraction caractéristique à mobilité extrême anodique (arc Z). La traînée de base d'allure légèrement différente de son homologue sauvage est désignée comme 11¹.
- 5.) A noter dans la comparaison des diagrammes de "fl" et d'"amyc" que les deux arcs Y2 et No. 12 ne sont pas les mêmes malgré l'emplacement et l'allure identique, comme cela ressort du test d'absorption (planche 8, fig. b).

1.2.2.3. Réactions hétérologues.

a) Analyse conduite avec l'immunsérum anti-Nc

L'immunoélectrophorégramme de l'homogénat du mutant "fl" développé avec les anticorps anti-Nc donne 9 arcs de précipitation.

Le même immunsérum révèle avec le deuxième mutant "amyc" 11 arcs de précipitation.

Dans ces deux réactions hétérologues n'apparaissent donc que les fractions protéiniques qui sont communes avec la souche sauvage. Malgré la grande similitude d'intensité, il y a des modifications dans la disposition des arcs.

Il faut souligner l'absence de l'arc à mobilité légèrement cathodique (No. 13) dans les deux diagrammes.

b) Analyse conduite avec l'immunsérum anti-"fl"

Les fractions communes à la souche "fl" sont ainsi dénombrées:

7 arcs de précipitation, lorsque l'extrait "amyc" est opposé à l'antisérum "fl".

7 arcs de précipitation aussi, lorsque l'extrait de la souche sauvage est opposé à l'antisérum de "fl". Dans cette réaction il faut souligner l'absence de l'arc No. 13.

c) Analyse conduite avec l'immunsérum anti-"amyc"

Les antigènes de Nc contre l'antisérum d'"amyc"

révèlent un nombre de fractions communes assez important. Nous pouvons compter 11 arcs. Celui dont la mobilité est cathodique (arc 13) est absent. Lorsque nous appliquons l'extrait de "fl" contre le même antisérum anti-"amyc", un nombre moins important de fractions précipitantes est objectivé, soit 7 arcs.(Tableau 5).

Le tableau 6 résume les résultats de ces analyses, et les degrés de parenté qu'elles indiquent. En conclusion, ces réactions croisées permettent d'affirmer que les identités antigéniques observées portent sur un grand nombre de fractions. Il ressort toutefois de la différence du nombre d'arcs, que les souches "amyc" et "fl" présentent moins de parenté entre elles, que chacune par rapport au type sauvage.

Les deux réactions croisées entre "fl" et Nc n'ont pas donné deux nombres d'arcs de précipitation identiques.

En effet, l'immunsérum anti-Nc révèle opposé aux antigènes de "fl" 9 arcs de précipitation, tandis que l'immunsérum anti-"fl" opposé aux antigènes de Nc n'en révèle que 7. Ce fait peut trouver son explication dans la difficulté d'équilibrer le rapport antigène-anticorps quand, comme dans notre cas, l'antigène est constitué par un mélange complexe (ANDRIEU et coll., 1968).

TABEAU 5

IMMUNOPHOREGRAMMES REVELES PAR LES IMMUNSERUMS HETEROLOGUES

Communautés antigéniques des trois souches.

Dénombrement des fractions obtenues par immunoelectrophorèse en réaction hétérologue.

SOUCHES	FRACTIONS ANTIGENIQUES REVELEES PAR LE SERUM ANTI-NC														
NC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
"fl"	1		3	4	5	6	7		9	10	11				
"amyc"	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			12		
SOUCHES	FRACTIONS ANTIGENIQUES REVELEES PAR LE SERUM ANTI-"fl"														
"fl"	1	3	4	5	6	7	W	X	9	10	11	Y ¹	Y ²		
NC	1	3	4	5	6	7				10					
"amyc"	1	3	4	5	6	7				10					
SOUCHES	FRACTIONS ANTIGENIQUES REVELEES PAR LE SERUM ANTI-"amyc"														
"amyc"	Z	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 ¹	12		
NC		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		12		
"fl"		1		3	4	5	6	7			10				

TABLEAU 6

RESUME DES REACTIONS CROISEES EN A.I.E.

Communautés antigéniques des trois souches de Neurospora appréciées par les trois immunsérums.

ANTIGENES	IMMUNSERUMS		
	ATS Nc	ATS "fl"	ATS "amyc"
ATG Nc	15	7	11
ATG "fl"	9	13	7
ATG "amyc"	11	7	13

1.2.2.4. Réactions d'absorption

Le même principe d'épuisement de l'immunsérum, déjà employé en double diffusion simple (cf. 1.2.1.5.), a été appliqué pour l'A.I.E.. Nous avons laissé diffuser les antisérums à partir des rigoles en présence d'un excès d'antigènes hétérologues. La fraction spécifique de chaque souche est ainsi isolée et, en plus, localisée selon sa charge dans le contexte d'un immunoélectrophorégramme global.

A. Réactions homologues

a) Absorption de l'immunsérum anti-Nc

Lorsque l'immunsérum anti-Nc, absorbé par les protéines antigéniques du mutant "amyc", est appliqué contre ses antigènes homologues, il révèle encore un arc de précipitation. (planche 7, fig. a; photo 13). Cette fraction spécifique de la souche sauvage correspond à l'arc No. 13 de la planche 4 déjà mis en évidence sous 1.2.2.2.

Le même immunsérum absorbé par l'antigène hétérologue "fl" révèle encore, en réaction homologue, quatre arcs de précipitations, vraisemblablement les composantes antigéniques 2, 8, 12 et 14 déjà considérées comme manquantes chez "fl" au tableau 4. La réaction est schématisée par la fig. b de la planche 7 (photo 14).

b) Absorption de l'immunsérum anti-"fl"

Par opposition à l'absorption en double diffusion où seulement des halos diffus pouvaient être observés,

avec l'A.I.E., des réactions nettes subsistaient après l'épuisement de l'immunsérum anti-"fl".

Dans la réaction homologue après épuisement de l'antisérum par les antigènes du sauvage, un arc de précipitation persistait encore, ce dernier correspond à la fraction W, voir planche 8, fig. a; photo 15. Après l'épuisement avec les antigènes d'"amyc", trois arcs pouvaient être mis en évidence, soit le doublet $Y^1 + Y^2$ à faible mobilité anodique, soit la fraction W, voir schéma planche 8, fig. b; photo 16.

c) Absorption de l'immunsérum anti-"amyc"

L'immunoélectrophorégramme de la réaction homologue après épuisement de l'antisérum "amyc" par l'homogénat antigénique "fl", se compose de deux arcs de précipitation, fraction No. 8 et fraction Z. Une troisième fraction ll^1 n'est pas toujours présente (planche 9, fig. a; photo 17).

L'immunsérum d'"amyc" peut encore faire précipiter deux composantes, après l'absorption par les antigènes du sauvage; une trainée de base, fraction plutôt diffuse, correspondant vraisemblablement à la fraction ll^1 de la planche 6, et une fraction précipitante à une position extrême anodique, déjà mise en évidence dans la première absorption et correspondant à la composante Z. (photo 18).

Cette dernière réaction est schématisée dans la planche 9, fig. b.

B. Réactions hétérologues

Cette analyse, conduite avec les immunsérums saturés

par des antigènes hétérologues, appliqués successivement contre d'autres antigènes hétérologues, permet d'établir avec certitude la spécificité ou la communauté antigénique de certains composants isolés sous A. Les résultats de ces analyses sont groupés dans le tableau 7.

Les deux immunsérums anti-Nc et anti-"amyc" épuisés par les antigènes de "fl" et successivement appliqués contre les antigènes hétérologues non absorbants, révèlent encore un arc de précipitation. Il s'agit vraisemblablement du même arc, composant présent chez les souches Nc et "amyc" et absent chez la souche "fl".

D'après sa position dans le spectre cette fraction peut correspondre à l'arc No. 8.

L'immunsérum anti-"fl" par contre après épuisement peut développer des arcs de précipitation seulement contre les antigènes homologues.

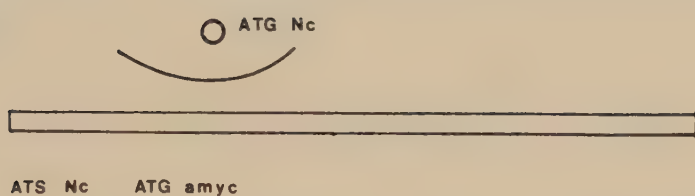
Ces résultats confirment la communauté antigénique plus forte entre le mutant "amyc" et la souche sauvage, qu'entre le mutant "fl" et la souche sauvage.

PLANCHE 7

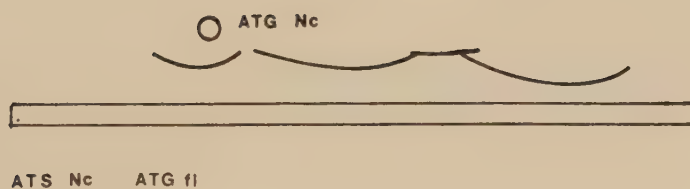
SCHEMA DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES
ANTIGENES DE Nc REVELES PAR L'IMMUNSERUM HOMOLOGUE
ABSORBE

fig. a. Réaction homologue avec l'immunsérum épuisé
par les antigènes hétérologues d'"amyc".

fig. b. Réaction homologue avec l'immunsérum épuisé
par les antigènes hétérologues de "fl".



a



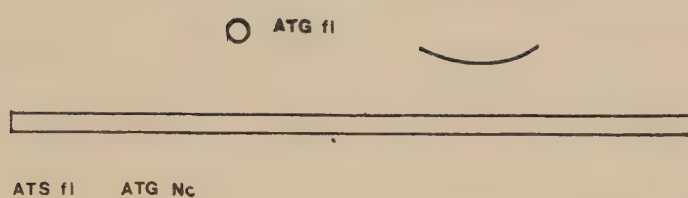
b

PLANCHE 8

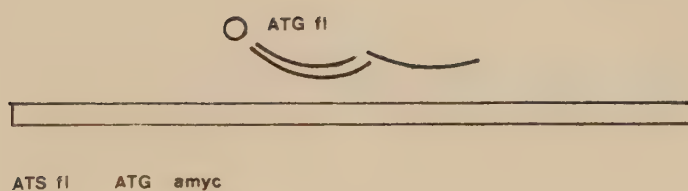
SCHEMA DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES
ANTIGENES DE "fl" REVELES PAR L'IMMUNSERUM HOMOLOGUE
ABSORBE

fig. a. Réaction homologue avec l'immunsérum épuisé
par les antigènes hétérologues de Nc.

fig. b. Réaction homologue avec l'immunsérum épuisé
par les antigènes hétérologues de "amyc".



a



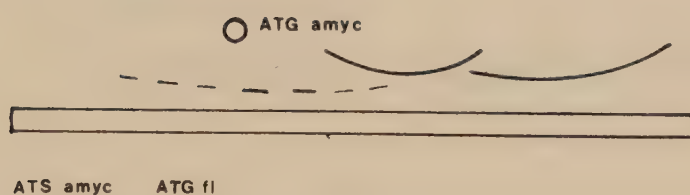
b

PLANCHE 9

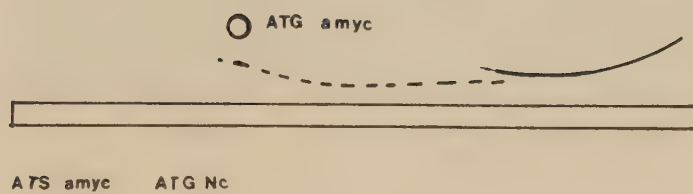
SCHEMA DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES
ANTIGENES D'"amyc" REVELES PAR L'IMMUNSERUM HOMOLOGUE
ABSORBE

fig. a. Réaction homologue avec l'immunsérum épuisé
par les antigènes hétérologues de "fl".

fig. b. Réaction homologue avec l'immunsérum anti-
"amyc" épuisé par les antigènes hétérologues
de Nc.



a



b

PHOTO 13. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique

de Nc révélé:

en bas, par son immunsérum homologue épuisé
par les antigènes d'"amyc" (flèche sur l'arc
différentiel);

en haut, par son immunsérum homologue brut.

PHOTO 14. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique

de Nc révélé:

en bas, par son immunsérum homologue épuisé
par les antigènes de "fl";

en haut, par son immunsérum homologue brut.

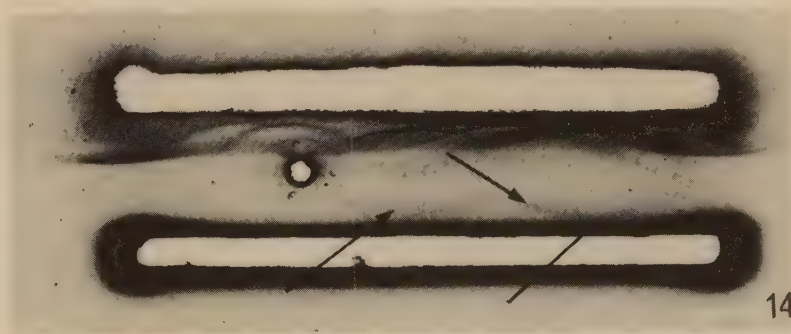
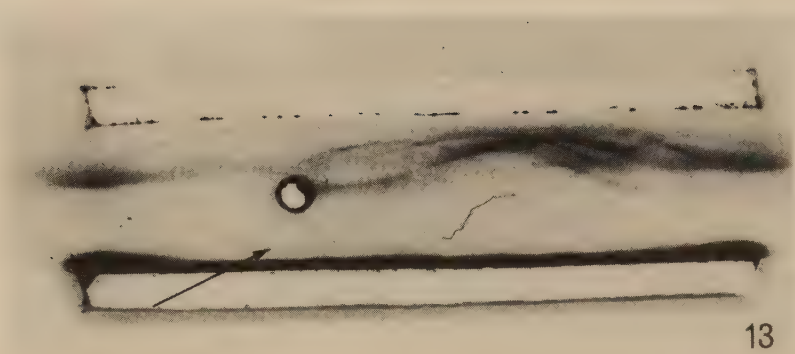


PHOTO 15. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique de "fl" révélé:
en bas, par son immunsérum homologue épuisé par les antigènes de Nc;
en haut, par son immunsérum homologue brut.

PHOTO 16. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique de "fl" révélé:
en haut, par son immunsérum homologue épuisé par les antigènes d'"amyc";
en bas, par son immunsérum homologue brut.

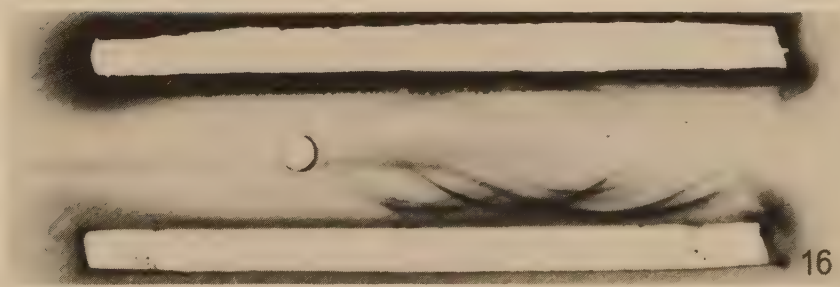
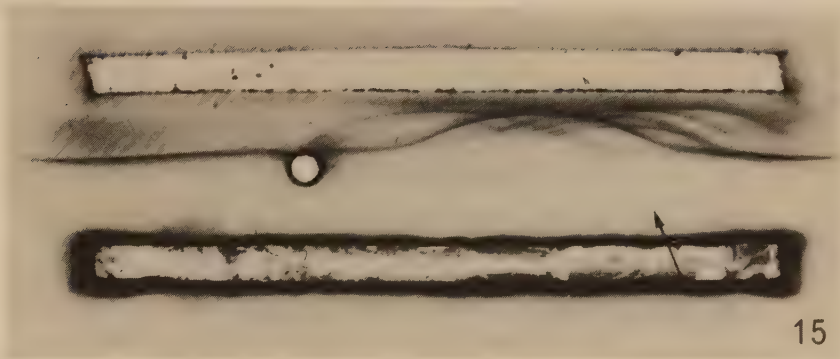


PHOTO 17. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique

d'"amyc" révélé:

en bas, par son immunsérum homologue épuisé

par les antigènes de "fl";

en haut, par son immunsérum homologue brut.

PHOTO 18. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique

d'"amyc" révélé:

en bas, par son immunsérum homologue épuisé

par les antigènes de Nc;

en haut, par son immunsérum homologue brut.

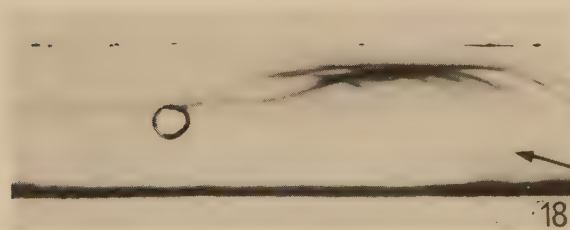
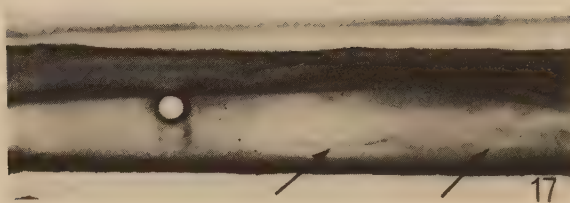


TABLEAU 7

REACTIONS HOMOLOGUES ET HETEROLOGUES EN IMMUNOELECTRO-
PHORESE AVEC LES IMMUNSERUMS ABSORBES

TABLEAU 7

		ANTIGENES		
		ATG Nc	ATG "fl"	ATG "amyc"
IMMUNSERUMS ABSORBES	ATS Nc + ATG "fl"	 4 Réactions Arcs 14,12,8,2.		 1 Réaction Arc 8.
	ATS Nc + ATG "amyc"	 1 Réaction Arc 13		
	ATS "fl" + ATG Nc		 1 Réaction Arc W.	
	ATS "fl" + ATG "amyc"		 3 Réactions Arcs Y ¹ , Y ² , W.	
	ATS "amyc" + ATG Nc			 1-2 Réactions Arcs 11 ¹ , Z.
	ATS "amyc" + ATG "fl"	 1 Réaction Arc 8.		 2-3 Réactions Arcs 11 ¹ , 8, Z.

1.2.3. Immunodiffusion en gel
d'agar après électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Cette technique conjugant à la fois la sensibilité de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité de l'immunodiffusion, a été appliquée pour améliorer la résolution de la séparation analytique de notre mélange de protéines (PEDUZZI et TURIAN, 1970). Notre but, en effet, a été celui de voir précipiter avec son anticorps correspondant une fraction protéinique, séparée au préalable par électrophorèse en gel de polyacrylamide; et ajouter ainsi une preuve supplémentaire de sa spécificité.

1.2.3.1. Composant différentiel d'"amyc" détecté
par électrophorèse en gel de polyacrylamide

Les distributions électrophorétiques des protéines pour les trois souches présentent des différences significatives. Les diagrammes obtenus pour chaque souche ont déjà été comparés dans le tableau 2.

Au niveau des bandes à forte mobilité, la différence la plus frappante est présentée par une bande supplémentaire chez le mutant "amyc" par rapport à la souche sauvage. Voir photo 19 et tableau 2, protéine au Rp 0'830.

1.2.3.2. Recherche de la propriété antigénique.

Comme autre évidence de la spécificité, il était intéressant de rechercher si cette fraction supplémentaire possédait des propriétés antigéniques. A cet effet, après migration électrophorétique de l'extrait d'"amyc", le gel d'acrylamide a été divisé dans le sens longitudinal. Sur une moitié, les protéines séparées ont été normalement révélées par l'amidoschwarz (photo 19).

L'autre moitié du gel a été logée dans un sillon pratiqué sur une plaque d'agar de façon à laisser diffuser les protéines contre les antisérums (homologue et hétérologue) placés dans des rigoles parallèles à une distance de 6 mm. Cette technique nous a effectivement permis de mettre en évidence, du côté du gel révélé par le sérum homologue anti-"amyc", un arc de précipitation caractéristique correspondant à la diffusion de la bande protéinique différentielle (photo 20).

PHOTO 19. Électrophorégramme en gel de polyacrylamide. A gauche, fractionnement des protéines extraites du type sauvage. A droite, fractionnement des protéines de la souche "amyc" (flèche sur le composé différentiel).

PHOTO 20. Lignes de précipitation obtenues après électrophorèse en gel de polyacrylamide et immunodiffusion en gel d'agar. 50 μ l d'extrait antigénique sont soumis à séparation électrophorétique. Dans les rigoles 100 μ l d'immunsérum.

A gauche: immunsérum homologue anti-"amyc".

A droite: immunsérum hétérologue anti-Nc.

Noter l'arc supplémentaire en position anodique extrême.

PHOTO 21. Plaque d'absorption. Réaction homologue.

Au centre: sérum anti-"amyc" épuisé par les antigènes de Nc.

Dans les puits externes: extrait antigénique d'"amyc" à différentes dilutions. Arc de précipitation spécifique pour la souche "amyc".

PHOTO 22. Plaque d'absorption. Réaction hétérologue.

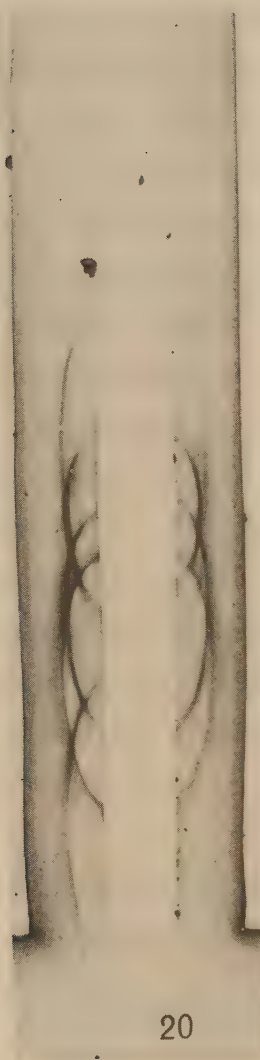
Au centre: sérum anti-"amyc" épuisé par les antigènes de Nc.

Dans les puits externes: en 1 extrait antigénique de "amyc"; en 2 extrait antigénique de Nc; en 3 extrait antigénique de "fl".

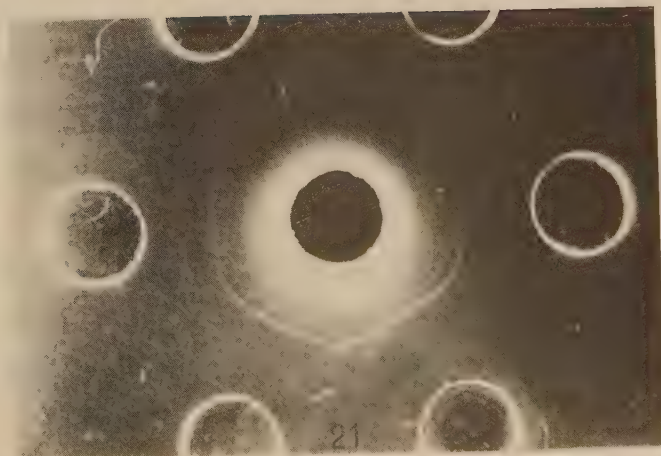
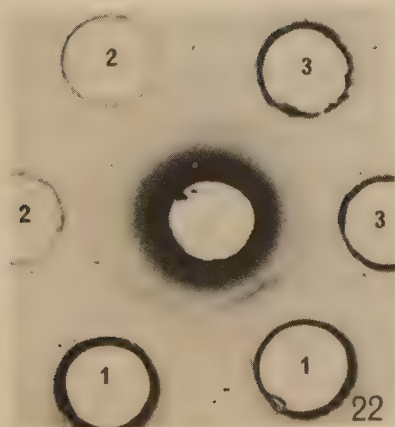
Aucune précipitation n'est observée par diffusion contre les antigènes hétérologues. L'absence de toute communauté antigénique de ce composant avec Nc et "fl" est à considérer comme preuve supplémentaire de la spécificité.



19



20



1.3. C o n c l u s i o n e t d i s c u s s i o n

Les diagrammes électrophorétiques obtenus se sont montrés reproductibles, caractéristiques et ont permis la différenciation nette des trois souches. Avec cette méthode 29 fractions ont été visualisées par l'amidoschwarz chez la souche sauvage. Les deux mutants par contre ont présenté un nombre moins élevé de bandes, soit 23 pour la souche "amyc" et 25 pour la souche "fl", mais des constituants qui leur sont propres ont pu être mis en évidence. La distribution différente et caractéristique des fractions, la différence d'intensité de coloration (différence quantitative des protéines extractibles par unité de poids lyophilisé), sont les preuves des variations survenues dans les protéines solubles et induites par les mêmes mutations géniques causes du changement morphologique.

En ce qui concerne les résultats obtenus en immuno-chimie, nous pouvons conclure que:

Les trois souches Nc, "fl" et "amyc" ont pu être caractérisées par leur propre immunoélectrophorégramme, parfaitement reproductible.

Un nombre très élevé de fractions antigéniques communes aux trois souches confirme l'existence d'une parenté très étroite entre elles. Toutefois, par épuisement des immunsérums avec les antigènes hétérologues, nous avons pu mettre en évidence des fractions spécifiques pour chaque souche.

La spécificité de ces fractions a pu être établie ensuite avec certitude par application des immunsérums saturés contre les antigènes hétérologues n'ayant pas

servi pour l'épuisement.

De même ces techniques ont révélé avec une sensibilité suffisante le degré de déficience de la différenciation conidienne des deux mutants morphologiques "fl" (absence absolue de macroconidies) et "amyc" (aschizogénie). Nous avons pu constater en effet un rapport antigénique beaucoup plus fort entre la souche "amyc" à macroconidiation abortive et le sauvage qu'entre la souche "fl" à déficience plus profonde et le sauvage.

Avec la technique décrite dans le paragraphe 1.3. nous avons souligné le fait que seulement un certain nombre de protéines mises en évidence par électrophorèse ont une propriété antigénique (facteur limitatif de l'immunochimie déjà mentionné dans l'introduction générale).

Le mutant "amyc", présente un produit supplémentaire caractéristique de l'activité physiologique de son génôme muté. L'antigénicité de ce même produit détecté par l'électrophorèse en gel d'acrylamide a pu être prouvée par une précipitation différentielle correspondant à la diffusion de la bande protéinique contre l'immunsérum homologue (PEDUZZI et TURIAN, 1970).

Ce composant protéinique que nous avons fait précipiter de façon différentielle en double diffusion, est vraisemblablement le même que nous avons observé parmi les fractions à forte mobilité anodique en A.I.E. (arc Z) et isolé par épuisement du sérum anti-"amyc" avec les antigènes du sauvage et de "fl".

2. CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIQUE
EN TANT QU'ARGUMENT TAXONOMIQUE POUR UN MUTANT ALBI-
NOS NATUREL DE NEUROSPORA INCONNU GENETIQUEMENT

L'aspect taxonomique de notre investigation a été dicté:

Premièrement par le besoin pratique de rajouter des arguments nouveaux d'ordre chimique, à un problème de classification d'une souche nouvelle, génétiquement inconnue.

Deuxièmement par la nécessité de vérifier, sur le plan de la systématique, la valeur des arguments immunochimiques et physicochimiques, par comparaison aux données classiques fournies par une étude morphologique.

En outre, pour tenter d'exclure la possibilité d'une identité éventuelle de la nouvelle souche avec un mutant albinos (al-2) de la collection du Laboratoire de Microbiologie, nous avons cherché à différencier sérologiquement les deux souches albinos et à comparer leurs protéines séparées sur colonnes d'acrylamide.

Dans le but de préciser la position taxonomique de la souche albinos nouvellement isolée, avec des critères sérologiques et électrophorétique nous avons employé, à titre comparatif, les souches suivantes:

- Nc, al-2, "fl", "amyc" et l'espèce N. sito
- pour cette étude il a été employé le milieu Ps.

2.1 A n a l y s e i m m u n o é l e c t r o p h o r é - t i q u e

Les immunoélectrophorégrammes des extraits des protéines solubles de la nouvelle souche al-Chg et de la souche al-2 révélés par les antisérums hétérologues comportent un nombre différent d'arcs de précipitation pour les 2 souches. Les résultats de ces réactions croisées sont schématisés dans le tableau 8.

Les fractions communes entre les extraits al-2, al-Chg et l'extrait du sauvage sont respectivement 7 et 11; on peut donc affirmer que l'apparement entre le sauvage et le mutant albinos isolé de la nature est le plus marqué. De plus, le nombre différent de précipitation de chacune des 2 souches al avec les autres sérums anti-"fl" et anti-"amyc" est une indication supplémentaire de la diversité existant entre souches albinos. Avec l'analyse comparée des structures antigéniques nous pouvons observer que les arcs de précipitation pour les deux extraits al ne se distinguent non seulement par leur nombre mais encore par leur emplacement (vitesse électrophorétique différente), par leur forme et aussi par leur intensité (photo 23 et 24).

Les immunoélectrophorégrammes des souches al-Chg et al-2 sont caractéristiques et parfaitement reproductibles, ce qui nous permet de les différencier l'une et l'autre et, d'autre part, de les reconnaître comme deux souches d'une même espèce. Le fait que l'extrait de N. sitophila révélé par le sérum anti-N. crassa ne donne que 3 arcs de précipitation (planche 9a) alors que les extraits de al-2 et de al-Chg

en révèlent respectivement 7 et 11 vient à l'appui du rattachement du mutant al-Chg à l'espèce N. crassa, dont notamment al-2 est un mutant produit artificiellement (HUNGATE, 1945).

PLANCHE 9a

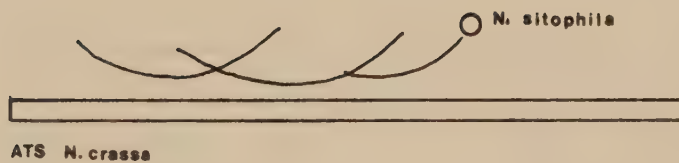


PLANCHE 9a

Schéma de l'analyse immunoélectrophorétique des structures antigéniques de N. sitophila révélées par l'immunsérum anti-Nc.

TABLEAU 8

REACTIONS EN A.I.E. DES SOUCHES ALBINOS ET N.
SITOPHILA

Réactions des deux antigènes albinos et de l'antigène de N. sitophila appréciés par les sérums anti-Nc, anti-"fl" et anti-"amyc".

ANTIGENES	IMMUNSERUMS		
	ATS Nc	ATS "fl"	ATS "amyc"
ATG al-2	7	6	5
ATG al-Chg	11	7	7-8
ATG N. sito	3	2-3	3

PHOTO 23. Extrait antigénique de al-Chg (déposé dans les puits externes) et de al-2 (déposé dans le puits central) révélés:

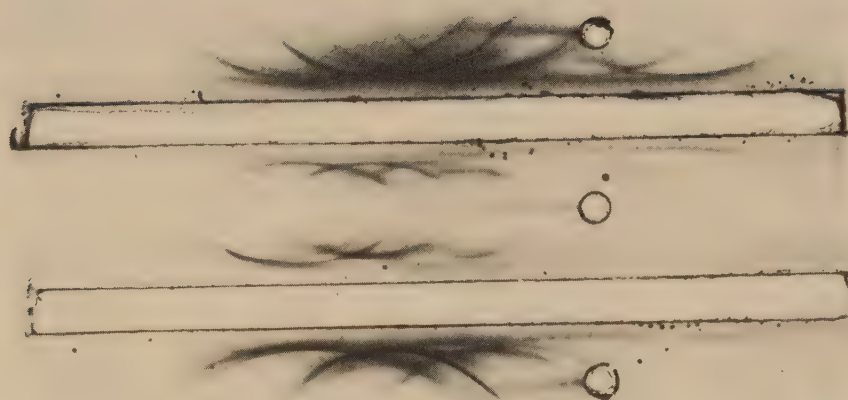
en haut par l'immunsérum anti-N.crassa,

en bas, par l'immunsérum anti-"amyc".

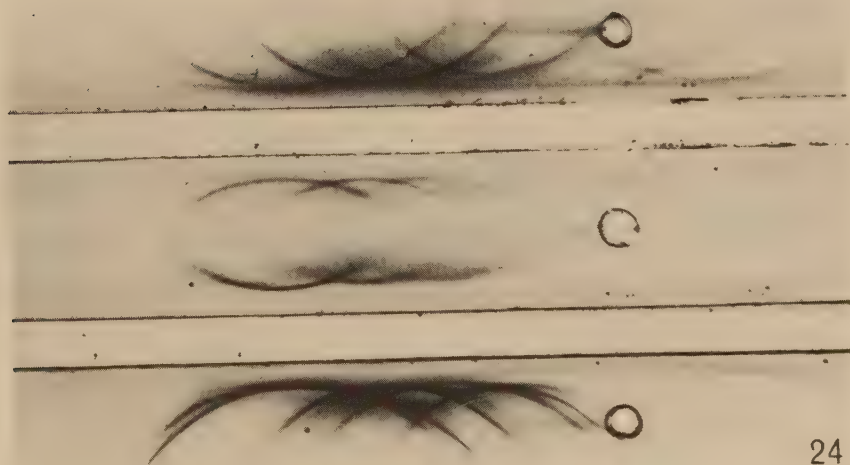
PHOTO 24. Même disposition des antigènes que pour photo 23:

en haut, appréciation par l'immunsérum anti-N.crassa,

en bas, par l'immunsérum anti-"fl".



26



24

2.2 Séparation des protéines sur colonnes d'acrylamide

L'établissement des protéinogrammes a confirmé, par le degré de corrélation satisfaisant des bandes, l'appartenance de al-Chg à l'espèce N. crassa. C'est ce que montrent les données du diagramme comparatif (tableau 9) établi selon le principe du rapport proportionnel proposé par WHITNEY et coll. (1968).

Le calcul de similarité par la formule de WHITNEY a donné les résultats suivants:

similarité de 67%	entre	<u>N. crassa</u>	et	<u>al-Chg/a</u>
"	"	51%	"	<u>N. crassa</u> et <u>al-2/a</u>
"	"	35%	"	<u>N. crassa</u> et <u>N. sitophila</u>
"	"	32%	"	<u>N. sitophila</u> et <u>al-Chg</u>
"	"	31%	"	<u>N. sitophila</u> et <u>al-2</u>

Ces valeurs viennent à l'appui de notre diagnostic établi par une étude parallèle sur une base morphologique, à savoir N. crassa al-Chg. (GINDRAT et coll., 1970).

TABLEAU 9

COMPARAISON DES DIAGRAMMES ELECTROPHORETIQUES EN GEL
D'ACRYLAMIDE POUR LES SOUCHES Nc, al-Chg, al-2 ET
N. sito.

Chaque diagramme des protéines est établi sur la base
de leur Rp.

Rp = rapport proportionnel, position relative de la
protéine par rapport à la distance parcourue par
le marqueur au bleu de bromophénol.

C_{Nc} = code établi pour le protéinogramme du type sau-
vage de N. crassa.

C _{Nc}	Rp	Nc	al-Chg	al-2	N.sito
A	0050				
	0074				
B	0095				
C	0105				
	0115				
	0130				
D	0150				
E	0205				
F	0235				
	0254				
G	0280				
	0305				
H	0330				
	0350				
I	0380				
	0400				
	0415				
J	0435				
	0450				
	0462				
K	0465				
L	0480				
M	0500				
N	0515				
O	0525				
	0535				
P	0555				
	0570				
	0585				
	0610				
Q	0620				
R	0640				
R ₁	0660				
	0690				
S	0710				
T	0735				
U	0760				
V	0780				
W	0805				
	0840				
	0855				
X	0865				
Y	0885				
	0905				
	0920				
Z	0955				
	0968				
	1000				

2.3 C o n c l u s i o n e t d i s c u s s i o n

La sérologie, comme nous l'avons déjà esquissé dans l'introduction générale (SEELIGER, 1955, 1968; TSUCHIYA et coll., 1965) et l'analyse immunoélectrophorétique (BIGUET et coll., 1965 a et b; ANDRIEU et coll., 1968) ont fourni des arguments de poids dans les questions critiques de la taxonomie des dermatophytes. Dans le cas présent, l'analyse immunoélectrophorétique nous a également permis de clarifier la position taxonomique de la nouvelle souche albinos de Neurospora isolée. C'est ainsi que l'on a pu montrer le degré de parenté de cette souche avec celle de N. crassa sauvage par comparaison du nombre d'arcs de précipitation (tableau 8). Il est par ailleurs intéressant de relever le nombre limité d'arcs de précipitation entre les deux espèces N. crassa et N. sitophila. Des différences immuno-électrophorétiques entre les deux espèces octosporées de Neurospora étaient déjà visibles dans les figures données par WILLIAMS et TATUM (1966).

De même, la séparation électrophorétique en gel d'acrylamide des protéines a confirmé les mêmes degrés de parenté (mutants et N. crassa) et de dissimilitude (N. crassa et N. sitophila).

En conclusion, nous pensons avoir démontré que le mutant albinos a isolé est différent de celui (albinos al-2 a) avec lequel il aurait pu être confondu.

La valeur taxonomique de l'immunoélectrophorèse et de la séparation électrophorétique des protéines solubles en gel de polyacrylamide est discutée au moyen

d'une discrimination inter- et intraspécifique:

1. Discrimination interspécifique

Les immunoélectrophorégrammes et le spectre protéinique obtenus avec l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ont mis en évidence le degré beaucoup plus élevé de corrélation existant entre les mutants albinos (al-Chg et al-2) et le type sauvage de N. crassa qu'avec celui de N. sitophila.

2. Discrimination intraspécifique

Nous avons pu confirmer les données morphologiques et désigner la nouvelle souche N. crassa al-Chga (Neurospora crassa albinos Changins) en la distinguant en même temps d'une autre souche mutante albinos (al-2, isol. 15.300 a) de la même espèce, à l'étude dans notre laboratoire.

3. ETUDE IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIQUE DE LA CONIDIATION

La conidiation de Neurospora crassa, utilisée comme modèle de différenciation cellulaire, a été étudiée sous différents angles:

ultrastructural (WEISS, 1965; WEISS et TURIAN, 1966; LOWRY et coll., 1967), métabolique (OULEVEY et TURIAN, 1968) et génétique (GRIGG, 1960). L'approche avec des tests sérologiques n'a pas encore été envisagée.

L'immunochimie peut fournir, comme il a été démontré surtout en morphogénèse des Myxomycetes (SONNEBORN, 1964; GREGG, 1961, 1968) et des animaux (WOLFF et coll., 1964), un moyen sensible de détection des changements macromoléculaires spécifiques devant accompagner nécessairement la différenciation cellulaire.

Nous avons pensé appliquer cette même méthode dans le cas particulier, de la différenciation conidienne (PEDUZZI et TURIAN, 1969, I).

Dans le même contexte morphogénétique, parallèlement à notre étude immunochimique, nous avons jugé utile d'effectuer un contrôle de la croissance basé sur l'estimation du poids lyophilisé de la masse mycelienne d'une unité de culture ainsi qu'une estimation de son taux protéinique. Il est reconnu que des analyses globales (poids sec, dosage de protéines totales, etc.), peuvent donner des renseignements sur l'évolution et la déviation des métabolismes, mais l'information obtenue n'est pas suffisante pour élucider le mécanisme intime des phénomènes.

Cependant les paramètres obtenus avec ces contrôles donnent des renseignements précieux quant à la proportion des protéines composant le mycélium, ainsi que sur la fraction des protéines extractibles de l'homogénat sur lequel on a basé, au quatrième jour, notre étude sérologique.

Pour l'examen immunochimique nous avons employé:

les souches: Nc et "amyc"

les milieux: Ps et Pa + succ. $10^{-2}M$

Pour le contrôle de la croissance au moyen des dosages globaux nous avons utilisé:

les souches: Nc, "fl" et "amyc"

les milieux: Ps, Ps + succ. $10^{-2}M$

Pa, Pa + succ. $10^{-2}M$ et + succ. $10^{-1}M$

3.1. Contrôle de la croissance par des dosages totaux

3.1.1. Poids du mycélium lyophilisé

Les résultats de l'estimation du poids des cultures lyophilisées sont représentés dans les planches 10 et 11.

Les courbes ont été établies avec les valeurs moyennes de 5-6 dosages réalisés sur des matériaux obtenus au cours d'expériences différentes. La croissance est estimée toutes les 48 heures, par arrêt et récolte de la culture d'un seul flacon Erlenmeyer. Le graphique comparatif pour les trois souches cultivées sur Ps, permet les commentaires suivants:

la croissance, exprimée par l'augmentation du poids lyophilisé de la masse mycélienne, est assez divergente pour les trois organismes.

Les courbes nous révèlent un phénomène d'autolyse plus précoce chez le Nc que chez le mutant "fl", alors que la croissance chez l'"amyc" est progressive et continue (planche 10, graphique a).

Les résultats de l'estimation du poids lyophilisé des souches sauvage et "amyc" cultivées sur milieu Pa sont résumés dans la planche 10, graphique b, courbes à tirets.

Sur ce même graphique nous avons représenté pour comparaison les courbes des deux mêmes souches cultivées sur milieu Ps.

Le fait que l'acétate n'est pas une source de carbone efficace pour la croissance est ainsi nettement mis en évidence.

Les courbes de croissance des cultures du mutant "amyc" sur les milieux Ps, Ps + succ. 10^{-2} M, Pa, Pa + succ. 10^{-1} M, et Pa + succ. 10^{-2} M ont été comparées dans la planche 11. Les cultures qui ont poussé sur les deux milieux contenant du saccharose présentent des courbes ayant une allure pratiquement identique. Nettement différentes de ces dernières, mais assez semblables entre elles, sont les courbes illustrant le taux de croissance de la même souche sur les milieux contenant l'acétate (courbes à tirets).

PLANCHE 10

ESTIMATION DU POIDS LYOPHILISE

graphique a. Courbes de croissance des cultures sur milieu Ps:

en abscisse: poids lyophilisé d'une unité de culture en mg.

en ordonnée: âge de la culture en jours.

△——△ Nc

●——● "fl"

○——○ "amyc"

graphique b. Courbes de croissance des cultures de Nc et d'"amyc" sur milieu Ps et Pa;

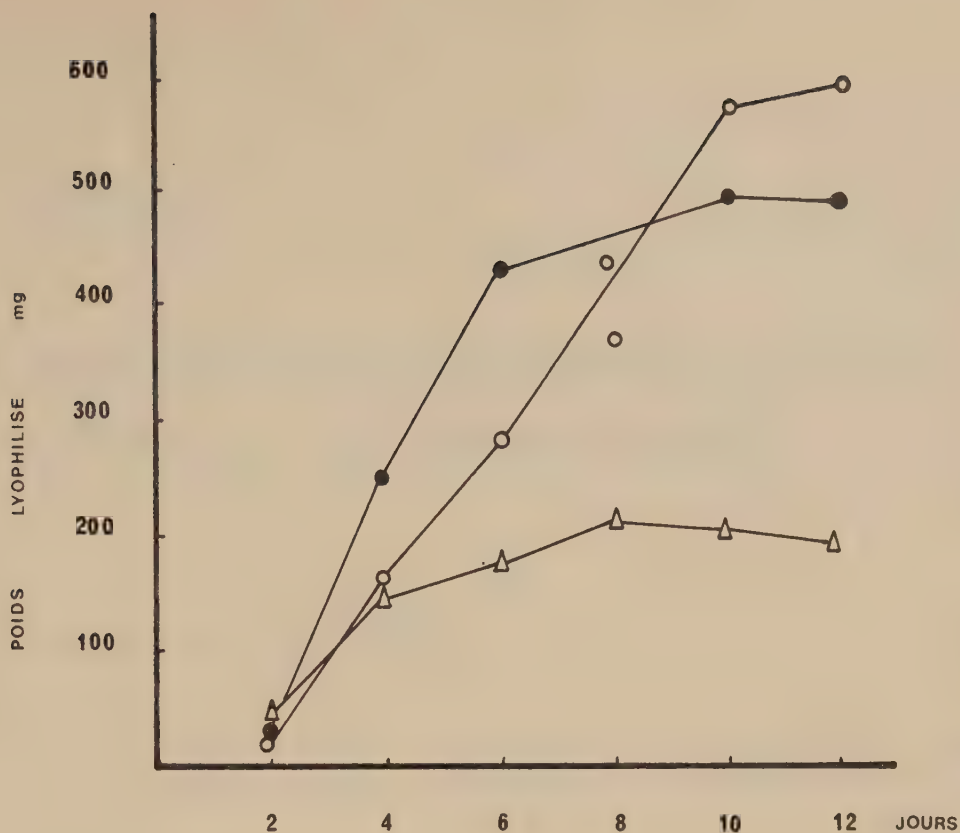
pour abscisse et ordonnée voir graphique a

△——△ Nc sur milieu Ps

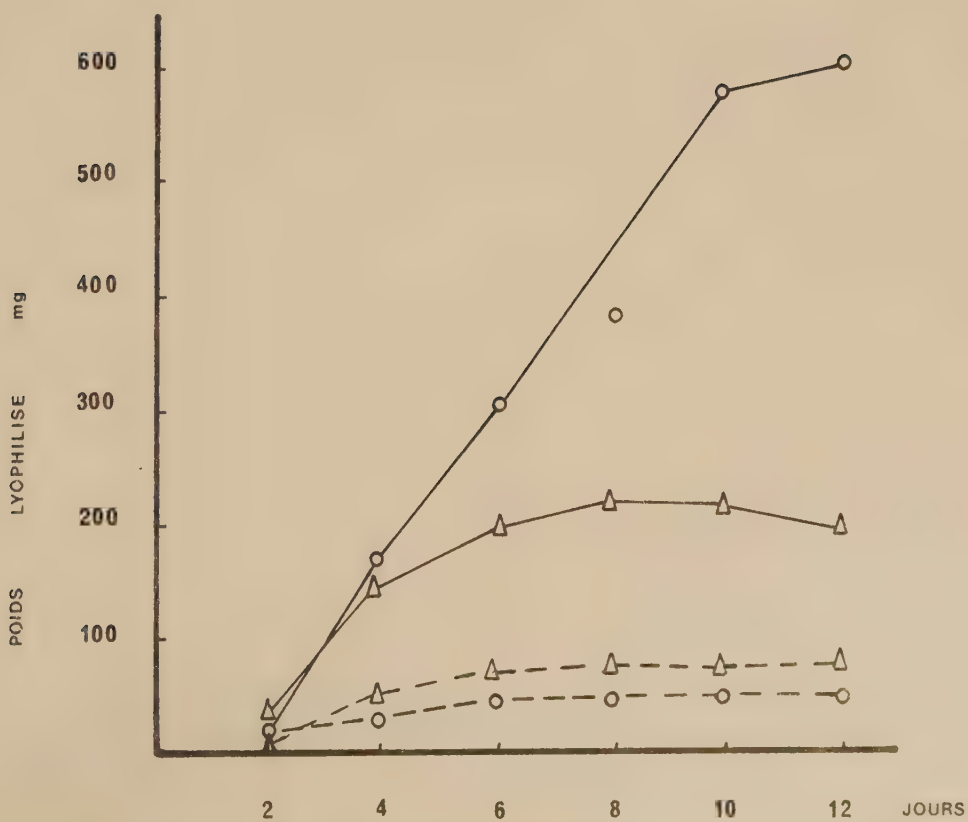
○——○ "amyc" sur milieu Ps

△---△ Nc sur milieu Pa

○---○ "amyc" sur milieu Pa



a



b

PLANCHE 11

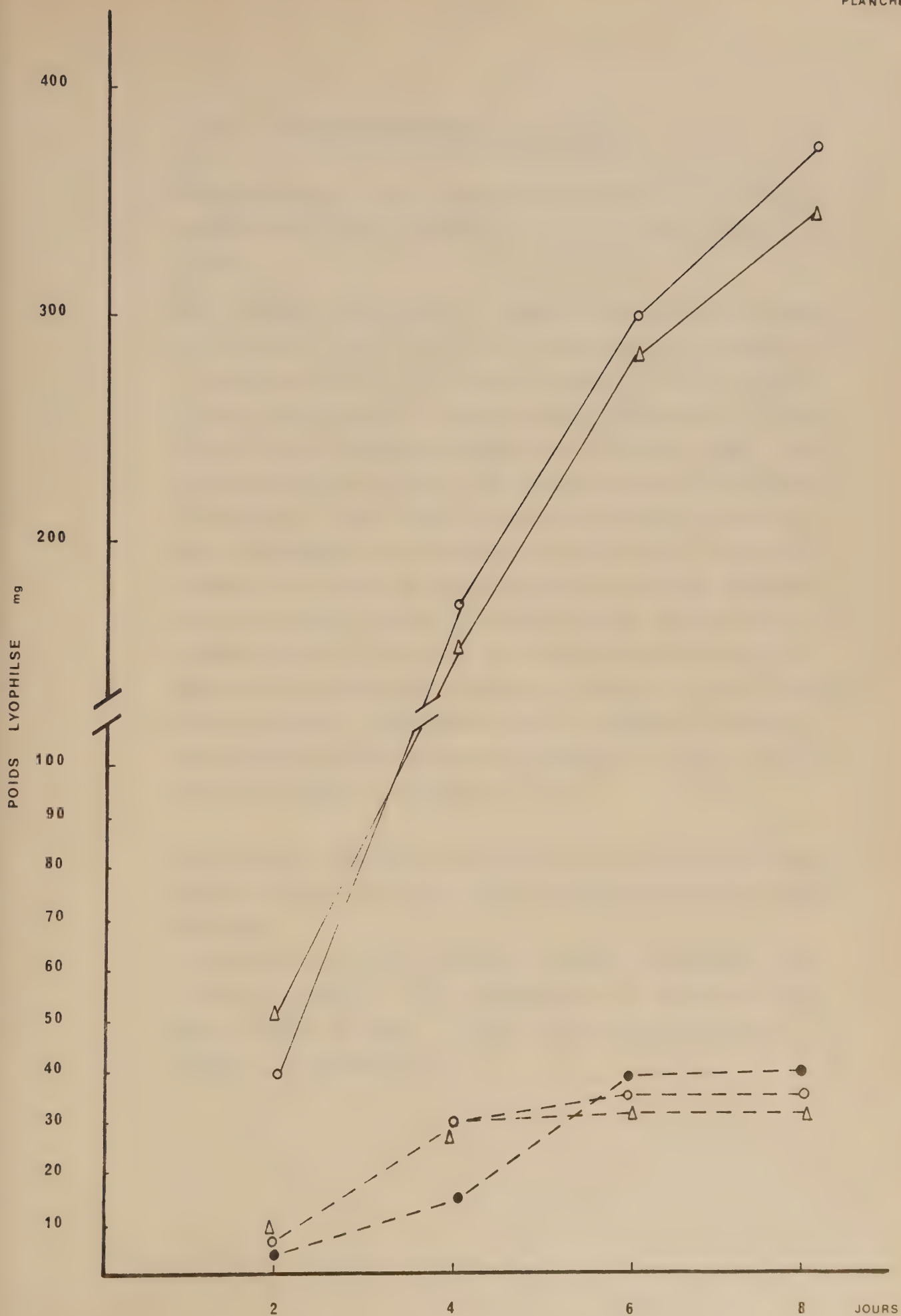
ESTIMATION DU POIDS LYOPHILISÉ DES CULTURES DU
MUTANT "amyc" SUR DIFFERENTS MILIEUX

Courbes de croissance:

en abscisse: poids lyophilisé d'une unité de culture
en mg.

en ordonnée: âge de la culture en jours.

- "amyc" sur milieu Ps
- △—△ "amyc" sur milieu Ps + succ. 10^{-2} M
- △---△ "amyc" sur milieu Pa
- "amyc" sur milieu Pa + succ. 10^{-2} M
- "amyc" sur milieu Pa + succ. 10^{-1} M



3.1.2. Taux protéinique du mycélium

Le graphique a de la planche 12 donne l'estimation quantitative des protéines totales précipitées au T.C.A.

Les courbes expriment la teneur protéinique en pourcentage du poids total de la culture lyophilisée et ne passent pas par des vrais maxima. L'allure générale indique que la teneur en protéines est la plus forte pour les trois souches au deuxième jour, stade le plus précoce auquel les dosages ont été effectués. Le rapport tombe ensuite assez brusquement pour le type sauvage à 144 heures tandis que chez les deux souches mutantes il reste presque constant jusqu'au dernier dosage effectué à 240 heures. Toutes les valeurs formant la courbe ont été établies avec les moyennes de plusieurs dosages effectués avec la réaction du biuret appliquée dans la méthode d'extraction-analyse protéinique de RACUSEN et coll. (1961) (cf. Matériel et méthodes, 5.2).

Les courbes donnant le dosage de la fraction protéinique soluble ont une allure analogue pour les trois souches.

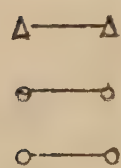
Le taux de la partie soluble diminue nettement avec l'âge du mycélium. Les graphiques des dosages faits selon LOWRY et coll. (1951) sont donnés dans la planche 12 graphique b.

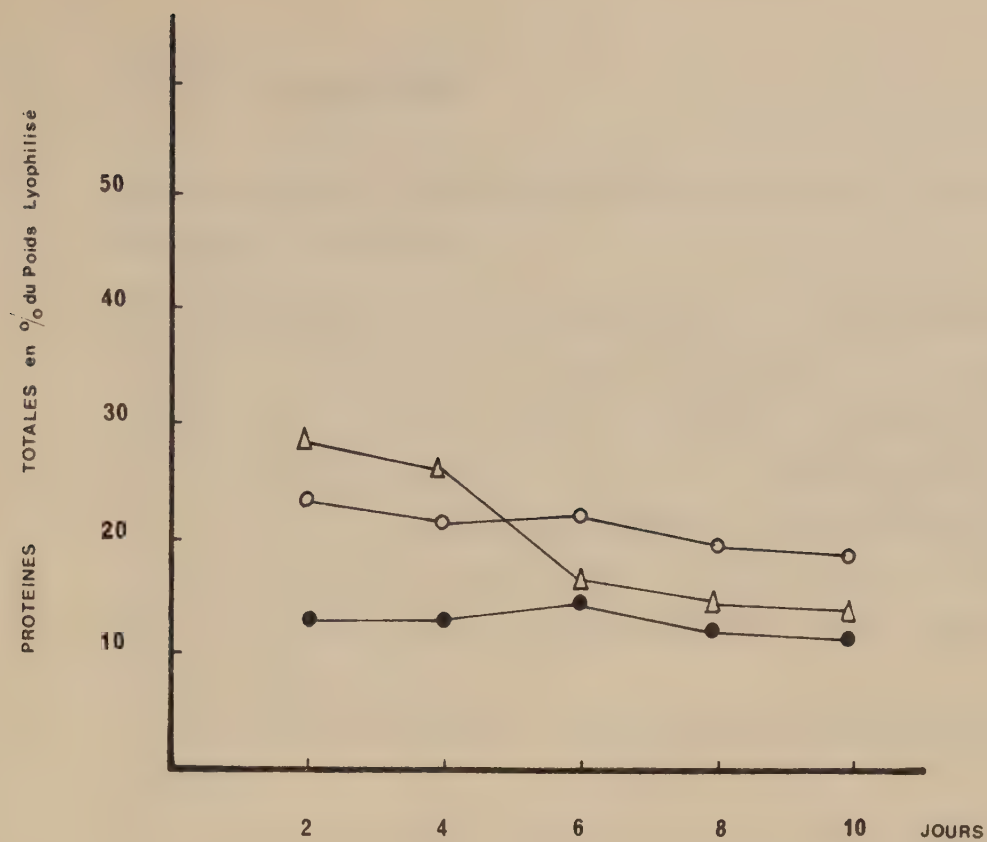
PLANCHE 12

graphique a. Rapport: protéines totales / poids lyophilisé;
en abscisse: teneur du mycélium en protéines, exprimée en pourcentage du poids lyophilisé;
en ordonnée: âge de la culture en jours.

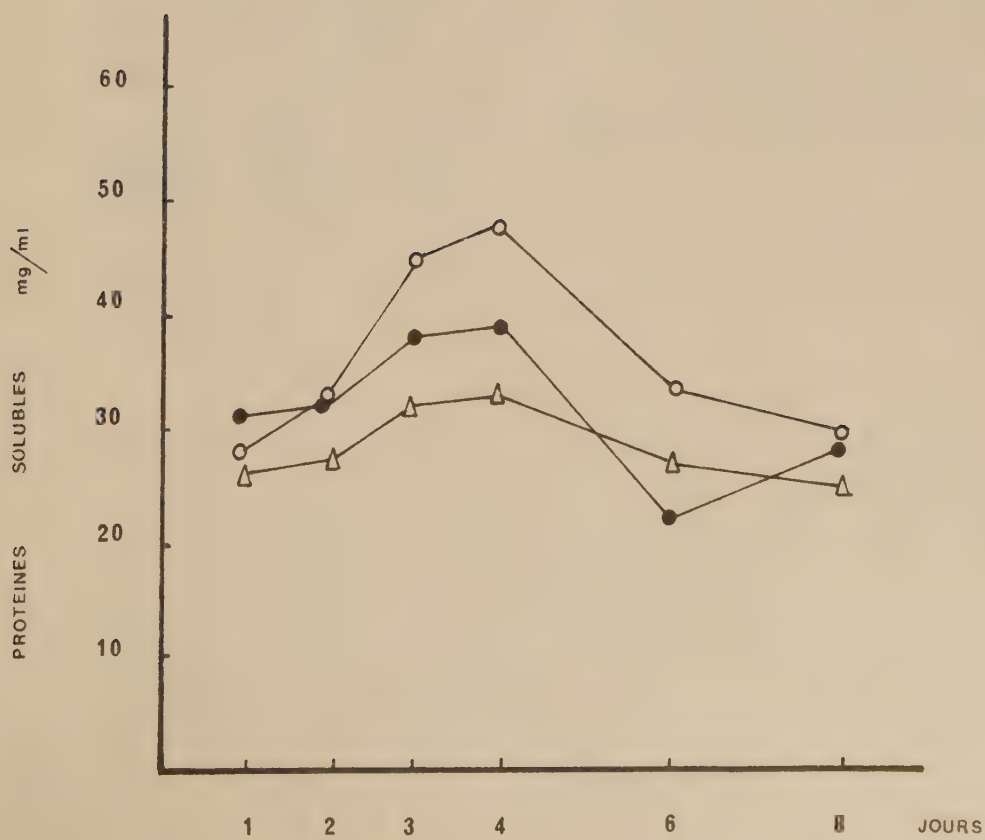
 Nc
"fl"
"amyc"

graphique b. Courbes donnant les dosages des protéines extraites et solubilisées par la méthode habituelle (cf.II 4.);
en abscisse: la teneur en protéines exprimée en mg. par ml. de la solution protéinique;
en ordonnée: âge de la culture en jours.

 Nc
"fl"
"amyc"



a



3.1.3. Conclusions

En considérant les résultats des dosages totaux nous pouvons relever que:

les protéines totales rapportées au poids absolu du mycélium donnent des valeurs présentant des corrélations avec le poids même du mycélium lyophilisé (par le fait que le rapport tend à se maintenir constant). Par contre les protéines solubles extractibles au tampon phosphate rapportées au même poids ne sont pas en corrélation et subissent une plus forte diminution avec l'âge.

Nous pouvons expliquer ces faits par les raisons suivantes:

la méthode d'extraction au T.C.A. fait ressortir une augmentation des protéines totales parallèle à l'augmentation du poids lyophilisé. Cela est dû au fait que ce procédé permet de doser aussi les protéines de structure impliquées dans le processus de l'augmentation des matériaux de soutien. Les mêmes protéines de structure restent insolubles quand l'extraction est faite par le tampon phosphate. En conséquence le rapport protéines solubles / poids lyophilisé diminue avec l'âge.

3.2. Mise en évidence par l'A.I.E. de modifications protéiques dépendant du temps de croissance

Pour cette partie de notre investigation nous avons utilisé les mêmes antisérums déjà employés sous III, 1 et 2. Ces immunsérums contiennent des anticorps produits contre les protéines solubles extraites de cultures âgées de 96 heures.

Ne possédant pas de sérums spécifiques pour chaque phase, nous n'avons pas pu étudier d'une manière détaillée la structure antigénique de chaque phase du cycle de transformation morphologique. Il nous a cependant été possible de suivre l'apparition progressive des protéines-antigènes contre lesquelles nous possédions les anticorps (96 heures).

Nos résultats se rapportent à l'A.I.E. de la structure antigénique de cultures de Neurospora crassa sauvage âgées de 36 heures et 72 heures.

A 36 heures nous n'avons pu révéler que 4 fractions antigéniques avec le sérum anti-sauvage.

Ces 4 antigènes communs à l'étape considérée et à la phase conidiée reflètent un état fonctionnel constant du mycélium à croissance végétative persistant à la conidiation.

Par contre, à 72 heures la présence de presque tout le spectre du diagramme A.I.E. de base (96 heures) reflète l'instauration progressive d'un état fonctionnel du mycélium propre à l'état sporulé.

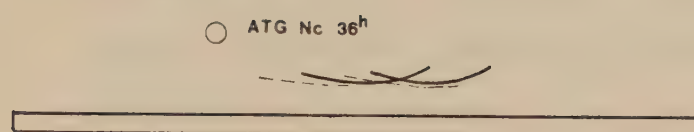
Les 2 immunophorégrammes sont donnés à la planche 13 fig. a et b et photo 25.

PLANCHE 13

SCHEMA DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES
ANTIGENES DU SAUVAGE APPARTENANT A CULTURES D'AGES
DIFFERENTS

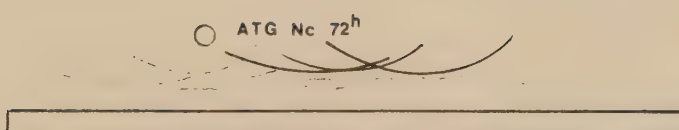
fig. a. Extrait antigénique d'une culture de 36 heures
révélé par l'immunsérum anti-Nc (produit contre
les protéines - antigènes d'une culture de 96
heures).

fig. b. Extrait antigénique d'une culture de 72 heures
révélé par l'immunsérum anti-Nc.



ATS Nc

a



ATS Nc

b

PHOTO 25. Immunoélectrophorèse des antigènes du type sauvage appartenant a cultures d'âges différents.

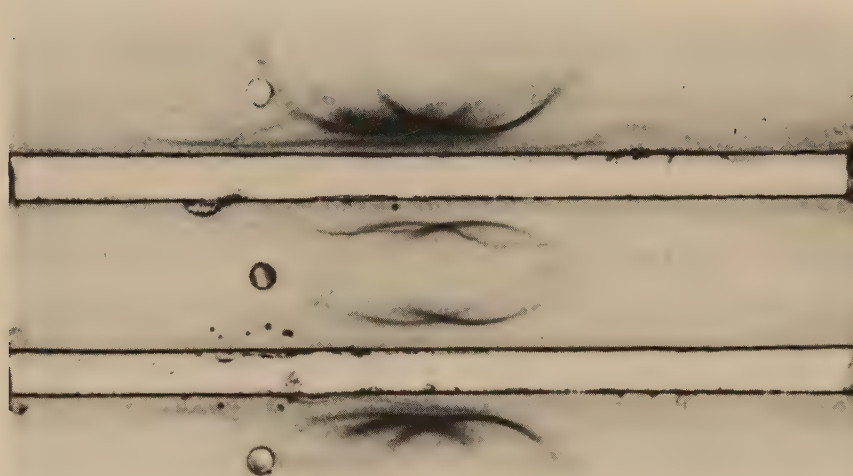
Dans les deux rigoles nous avons déposé l'immunsérum anti-Nc (contenant les anticorps produits contre les protéines - antigènes d'une culture de 96 heures).

Dans le puits central: extrait antigénique d'une culture de 36 heures.

Dans les puits externes:

en bas, extrait antigénique d'une culture de 48 heures;

en haut, extrait antigénique d'une culture de 72 heures.



3.3. Mise en évidence d'un constituant spécifique lié à l'évènement morphogénétique

Les diagrammes A.I.E. des deux souches mutantes, toujours en gardant leurs caractéristiques, présentent des déficiences communes par comparaison au diagramme du sauvage (planches 4, 5 et 6; photos 10, 11, et 12); ceci concerne surtout des fractions antigéniques à faible mobilité qui forment des arcs de précipitation dans la zone cathodique.

Les photos 26 et 27, illustrent la structure des antigènes de N. crassa sauvage obtenue sur la même lame en réaction croisée avec l'immunsérum homologue et les immunsérums hétérologues anti-"amyc" et anti-"fl". Dans les deux comparaisons le diagramme homologue du sauvage possède une fraction très marquée en position légèrement cathodique, qui ne trouve pas de correspondant dans les arcs de précipitation révélés par les immunsérums anti-"fl" (photo 26) et anti-"amyc" (photo 27).

Après avoir considéré ce constituant légèrement basique spécifique de la souche sauvage par rapport aux deux souches mutantes à conidiation déficiente, les résultats présentés dans ce paragraphe se rapportent à des expériences concernant la souche sauvage et la souche mutante aschizogène "amyc".

Les identités et les différences antigéniques entre la souche conidienne sauvage et la souche mutante "amyc" ont déjà été mises en évidence par absorption en immunoélectrophorèse (planche 7, fig. a; planche 9, fig. b) et double diffusion (planche 3, fig. b).

La comparaison entre les structures antigéniques de ces deux souches a fait l'objet du paragraphe 1.2.3. des résultats où nous avons couplé l'électrophorèse en gel d'acrylamide avec la double diffusion.

La souche "amyc" offre un intérêt particulier pour notre investigation du fait qu'elle à pu être placée dans des conditions de récupération du pouvoir conidiogène (DICKER et coll., 1969). Cette souche aschizogénique se comporte ainsi comme un mutant aconidien conditionnel; elle peut en effet être induite à la conidiation sur un milieu oxydatif comprenant l'acétate et le succinate comme sources de C (milieu Pa + su).

Il était dès lors intéressant de rechercher si, parallèlement à la restauration de la fonction conidiogène, l'arc de précipitation dû à l'antigène caractéristique de la souche sauvage conidiogène réapparaissait.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué la réaction hétérologue entre les extraits d'"amyc"-induit sur acétate + succinate et le sérum de la souche sauvage contenant l'anticorps spécifique pour la fraction No. 13 mise en évidence plus haut (cf. absorption; planche 7, fig. a; photo 13).

Cette réaction nous a effectivement permis de retrouver l'arc de précipitation caractéristique de la souche sauvage conidiogène (photo 28). Nous pouvons dès lors penser que cet arc caractéristique de la souche sauvage et qui accompagne la restauration de la capacité conidiogène chez le mutant considéré, représente un composant antigénique impliqué dans la différenciation des macroconidies de Neurospora.

Parallèlement à l'étude immunochimique nous avons pensé établir aussi le diagramme électrophorétique de la

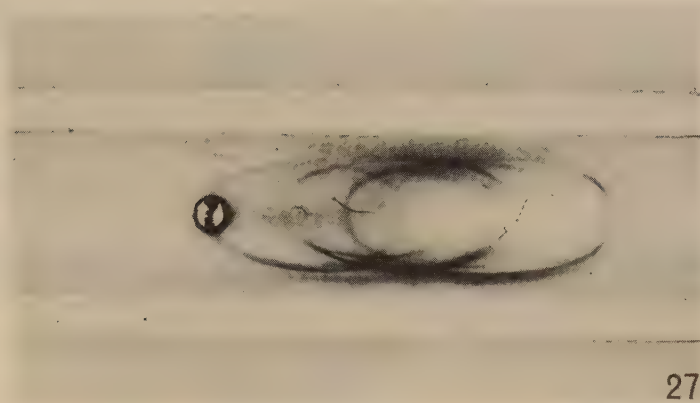
souche "amyc" sur acétate-succinate. Au tableau 10 nous avons rapporté les spectres des protéines solubles des deux souches sauvage et "amyc" sur milieu Ps afin d'établir une comparaison directe avec le spectre des protéines solubles du mutant "amyc" induit sur milieu acétate-succinate. Les bandes du spectre protéinique de la souche mutante cultivée sur milieu conidiogène varient par rapport à celles de la même souche normalement cultivée.

Pour déterminer le degré de similarité entre souche sauvage et souche mutante-induite, nous avons apprécié les bandes du diagramme par la formule de WHITNEY et coll. (1968). L'application de cette formule nous a permis de calculer que le 47% de bandes homologues entre souche sauvage et mutante sur milieu Ps normal (cf. résultats 1.1.) est monté à 85% quand le mutant a été induit à la conidiation. Cette augmentation rend compte de l'apparition de bandes communes correspondant très vraisemblablement à la récupération du pouvoir conidiogène par le mutant.

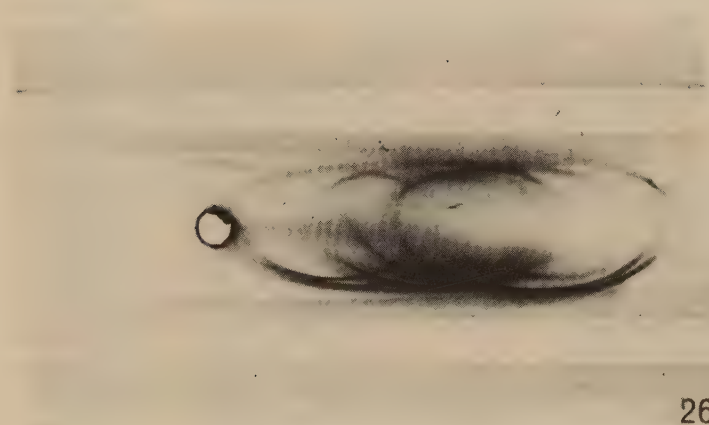
PHOTO 26. Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique de Nc révélé:
en bas, par l'immunsérum hétérologue anti-"fl";
en haut, par son immunsérum homologue.

PHOTO 27. Immunoélectrophorèse de l'extrait de Nc révélé:
en bas, par l'immunsérum hétérologue anti-"amyc";
en haut, par son immunsérum homologue.

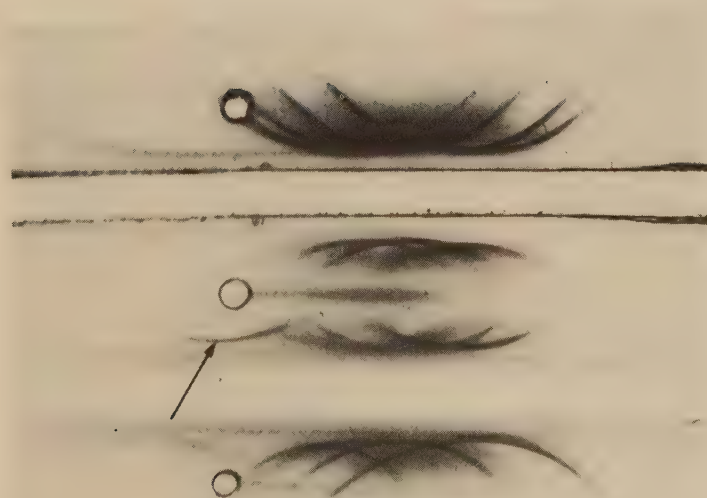
PHOTO 28. Récupération de l'arc no. 13 par le mutant "amyc"-ind.
Extrait antigénique d'"amyc" induit à conidiation (puits central) révélé par l'immunsérum anti-"amyc" non induit (rigole en haut) et par l'immunsérum anti-Nc (rigole en bas);
flèche = arc différentiel récupéré). Dans les puits externes ont été déposés:
en haut, l'antigène "amyc";
en bas, l'antigène Nc.



27



26



28

TABLEAU 10

COMPARAISON DES DIAGRAMMES ELECTROPHORETIQUES EN GEL
D'ACRYLAMIDE POUR LES SOUCHES Nc, "amyc" ET "amyc"-ind.

Chaque diagramme des protéines est établi sur la base
de leur Rp.

Nous avons donné le code établi pour le protéino-
gramme du type sauvage (code).

Les protéines de la souche sauvage donnent un dia-
gramme électrophorétique pratiquement identique selon
que la souche est cultivé sur du saccharose ou sur
de l'acétate. Les seules différences résident dans
l'intensité de certaines bandes, donc d'ordre quanti-
tatif, et n'ont pas été représentées sur notre schéma.

R = bandes récupérées par le mutant mis en condition
conidiogène

code	Rp	NC +	amyc P _s	amyc Pa su
A	0050			
B	0095			
C	0105			
	0117			
	0130			
D	0147			R
E	0205			
	0220			
F	0238			
G	0280			R
	0303			
H	0325			
	0360			
I	0380			R
	0400			
J	0435			
K	0465			
L	0480			R
M	0500			
N	0515			R
O	0527			
P	0555			
	0590			
Q	0620			
R	0640			R
R ₁	0670			
S	0708			R
T	0735			
U	0760			R
V	0780			
W	0805			R
	0839			
X	0860			R
Y	0885			
Z	0946			
	1000			

3.4. C o n c l u s i o n e t d i s c u s s i o n

La méthode immunoélectrophorétique nous a permis de caractériser des protéines en fonction de l'âge de la culture. Au cours de la croissance nous avons observé une augmentation du nombre de fractions protéiniques identiques à celles que nous trouvons usuellement dans la culture âgée de 96 heures ayant servi pour la préparation des anticorps.

Avec la même méthode, nous avons pu détecter un composant antigénique associé à la différenciation conidienne du type sauvage et du mutant placé dans des conditions de récupération du pouvoir conidiogène (PEDUZZI et TURIAN, 1969, I).

4. ANTIGENE LIE A LA CONIDIATION SUPPORT D'UNE ACTIVITE ISOENZYMATIQUE

4.1. Critères du choix du système enzymatique étudié

Dans le chapitre 1.2.2, traitant de la caractérisation immunoélectrophorétique de la souche sauvage et des deux mutants aconidiens, nous avons mis l'accent sur l'isolement d'un arc de précipitation à faible mobilité cathodique, spécifique de la souche sauvage conidienne. Dans le chapitre 3.2 nous avons considéré une éventuelle relation existant entre une variation immunologique et l'expression d'une morphose. En effet il a été montré que la même fraction très spécifique pour la souche sauvage apparaissait parallèlement à la restauration de la fonction conidiogène chez le mutant "amyc". Cela nous a ainsi permis d'établir positivement le rapport fraction antigénique (arc No. 13) - événement morphogénétique (conidiation).

A l'appui de ces affirmations, il faut relever le fait que toutes les souches conidiennes de Neurospora crassa examinées jusqu'à maintenant (y compris les albinos, voir chapitre 2) possèdent dans leurs extraits la fraction indiquée (photos 23 et 24).

A ce point, il était donc intéressant de chercher à élucider le rôle fonctionnel de cette protéine dans l'expression de l'événement morphogénétique auquel on l'avait spécifiquement associée. Pour cela, la méthode A.I.E. choisie pouvait répondre à nos exigences

et nous permettre cette nouvelle étape biochimique de notre investigation. En effet, après avoir défini une substance sur la base de sa mobilité électrophorétique et de sa spécificité immunochimique, cette méthode peut parfois fournir un troisième critère d'appréciation: la composition chimique de la fraction antigénique par la mise en évidence d'activités biochimiques. On pouvait donc entreprendre l'examen d'une éventuelle activité enzymatique localisée au niveau de l'arc de précipitation spécifique.

Pour la mise en évidence de l'activité recherchée, il faut soumettre l'immunoélectrophorégramme obtenu à des réactions chromogènes couramment employées en cytochimie normale (LISON, 1960). A noter cependant que, si le site actif de l'enzyme est antigénique lui-même de façon à être directement engagé et par conséquent bloqué dans la réaction antigène-anticorps, l'activité enzymatique n'est plus révélabale.

Même si cette méthode était d'application facile, le problème de l'identification chimique de notre arc était loin d'être aisé à résoudre. Il fallait trouver la bonne réaction enzymatique, sélectivement chromogène pour notre constituant parmi les quinze arcs de précipitation du diagramme. Ce n'est qu'après avoir localisé et caractérisé l'arc support de l'activité catalytique, que le problème pouvait être considéré comme résolu.

Deux voies pouvaient alors être prospectées pour l'examen de notre problème:

- premièrement, essais au hasard de quelques réactions enzymatiques ou tout au plus considération, par une étude systématique, des réactions les plus communes.
- deuxièmement, examen d'un éventail restreint d'enzymes

que l'on a choisi particulièrement pour leur implication dans la croissance du mutant "amyc" sur de l'acétate-succinate.

Ayant opté pour la deuxième possibilité, le premier examen qui nous a semblé indispensable fut celui de déterminer laquelle des deux sources de carbone, acétate ou succinate, composant le milieu conidio-gène de notre mutant pouvait être considérée comme agent responsable de l'orientation métabolique.

Les cultures sur acétate comme seule source de carbone (milieu Pa) nous ont donné des résultats similaires quant aux effets morphogènes finaux à celles sur acétate-succinate (milieu Pa + succ.), voir photos 29 et 30. Nous savons déjà que la conidiation est simplement accélérée en présence du succinate (OULEVEY, inédit 1969). Il est clair cependant que l'acétate peut être considéré comme la base de la nouvelle voie métabolique.

Les cultures faites sur succinate seul (milieu P succ.) n'ont donné aucune croissance. Cela confirme que le succinate ne doit être considéré que comme adjuvant de cette nouvelle régulation induisant le mutant à conidiation.

Le fait d'avoir démontré que le vrai substrat inducteur était l'acétate nous permettait de considérer notre induction sous un angle nouveau et surtout de faire appel à une notion classique qui postule le cycle de l'acide glyoxylique comme voie alternative du nouveau métabolisme. Cela s'applique aux levures, moisissures et bactéries du fait qu'elles peuvent tirer leur énergie et croître avec des sources de carbone en C_2 comme l'acétate et l'éthanol. Déjà en 1958, KORNBERG avait trouvé ce système de régulation

et de synthèse de constituants cellulaires à partir d'acétate avec le concours du cycle glyoxylique. Trois nouvelles considérations devaient cependant encore conditionner notre recherche d'activité biochimique:

1. La caractérisation de types d'activité enzymatique après A.I.E. en agarose, s'adresse surtout à des enzymes catalytiques (oxydo-réductases et hydrolases) et particulièrement aux deshydrogénases. (BIGUET et coll., 1967; TRAN VAN KY et coll., 1966).
2. En considérant le métabolisme propre à la croissance sur acétate, et par conséquent la voie glyoxylique, pour le point 1. nous avons dû écarter les enzymes classiquement employés pour l'étude de cette voie c.à.d. les synthétases (isocitrate lyase et malate synthétase) (TURIAN, 1961, 1965; VANDERWINKEL, 1968; FLAVELL, 1969; COMBEPINE, 1969). Par un rapprochement assez simple nous avons pu choisir les deshydrogénases correspondantes c.à.d. malate deshydrogénase et isocitrate deshydrogénase.
3. Enfin les résultats d'une expérience réalisée avec les isotopes radioactifs ont eu un caractère déterminant pour le choix de la réaction enzymatique. La radioactivité de l'acétate se retrouvait concentrée sur le citrate et le malate et ce dernier étant très fortement marqué, plus que l'on pouvait s'attendre s'il était synthétisé avec le cycle de Krebs conventionnel (KORNBERG, 1966).

Pour toutes ces raisons, on a pensé entreprendre une

étude systématique et comparée, pour les trois souches dont on possédait les anti-sérums, de la malate déshydrogénase comme enzyme associé au cycle glyoxylique. Nous avons voulu montrer la distribution de cet enzyme dans les immunoélectrophorégrammes globaux des protéines endocellulaires révélés avec les immun-sérums des trois souches Nc, "fl" et "amyc".

PHOTO 29. Immunoélectrophorèse des extraits de la souche "amyc" cultivée sur les milieux:

Ps (saccharose);

Pa + succ. (acétate + succinate);

Pa (acétate).

Dans les deux rigoles nous avons déposé l'immunsérum anti-Nc.

Dans les puits externes:

en haut, extrait antigénique d'une culture d'"amyc" sur milieu Ps,

en bas, extrait antigénique d'une culture d'"amyc" sur milieu Pa.

Dans le puits central: extrait antigénique d'une culture d'"amyc" sur milieu Pa + succ.

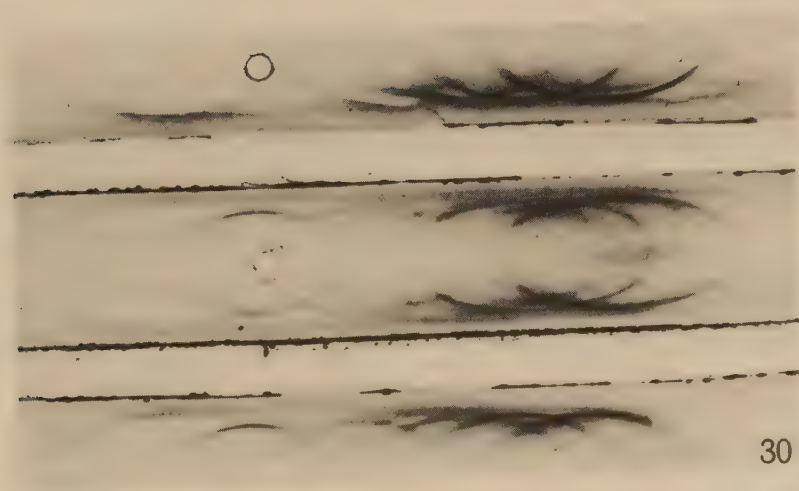
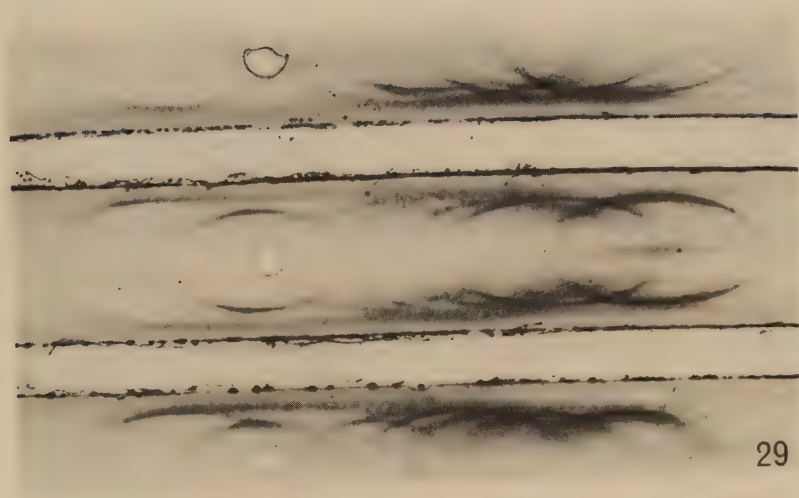
PHOTO 30. Immunoélectrophorèse des extraits de la souche "amyc" cultivée sur les milieux:

Pa + succ.; Pa; Ps + succ. (saccharose + succinate).

Même disposition des immunsérums et des antigènes provenant des cultures sur Pa et Pa + succ.

L'extrait antigénique de la culture faite sur milieu Ps + succ. est déposé dans le puits externe en haut.

De la comparaison de ces structures antigéniques il faut noter que la fraction liée à la conidiation (arc no. 13) n'est présente que lorsque les cultures sont faites sur des milieux contenant de l'acétate.



4.2. Identification après A. I. E. en agarose de la malate déshydrogénase (MDH)

Nos analyses ont donné les résultats suivants:

- a) Dans le broyat total de la souche sauvage révélée par l'immunsérum homologue, l'activité de la MDH a été mise en évidence au niveau de l'arc de précipitation spécifique de cette souche (cf. absorption, planche 7, fig. a). Parallèlement deux autres fractions antigéniques présentaient une activité MDH:

une fraction localisée en position nettement anodique, une autre fraction formant une ligne de précipitation assez longue et presque rectiligne (planche 14, fig. a; photo 31). Ces trois fractions, correspondant vraisemblablement à trois isoenzymes (pour la discussion sur la nature des isoenzymes voir MARKERT et WHITT, 1968), présentent la même intensité de coloration et trouvent des correspondances parmi les fractions antigéniques colorées à l'amidoschwarz. (planche 4, arcs Nos. 11, 12 et 13; photo 10).

La dénomination de ces lignes de précipitation a été établie comme suit (PEDUZZI et TURIAN, 1969, II):

- MDH₁, fraction antigénique à mobilité anodique
- MDH₂, " " " " cathodique
- MDH₃, " formant une ligne de base allongée

D'après cette désignation l'arc crucial spécifiquement lié à la souche sauvage et au pouvoir conidio-gène (cf. paragraphe 3.3 des résultats) se trouve

être MDH₂, voir planche 4, arc No. 13.

Ces trois isoenzymes sont révélés après 60 min. d'incubation aussi bien avec NAD qu'avec NADP comme coenzymes.

b) Dans l'immunoélectrophorégramme global de la souche "amyc" (normalement cultivée sur milieu Ps) développé avec le sérum homologue, un seul arc est support d'activité malate-déshydrogénasique (photo 32). Cet arc a une mobilité anodique moyenne et correspond à la fraction appelée MDH₁ dans le diagramme homologue A.I.E. du sauvage, (planche 14, fig. b). Dans la réaction hétérologue, extrait d'"amyc" contre immunsérum anti-Nc, les précipitines anti-MDH₂ et anti-MDH₃ ne trouvent pas de fractions précipitantes correspondantes et seule la fraction MDH₁ est mise en évidence.

c) Dans le broyat total de la souche "amyc" cultivée sur acétate révélé par l'immunsérum anti-Nc contenant la précipitine spécifique pour l'arc No. 13 lié à la conidiation, 2 fractions antigéniques supportent une activité malate-déshydrogénasique. Les deux arcs correspondent d'après la désignation établie pour le spectre du sauvage aux isoenzymes MDH₁ et MDH₂ (planche 14, fig. c; photo 33).

Sur le diagramme A.I.E. de la réaction homogénat d'"amyc" cultivé sur acétate contre immunsérum anti-"amyc", seul l'arc MDH₁ a été mis en évidence. Ces résultats suggèrent donc que la protéine récupérée correspond à l'isoenzyme MDH₂ (PEDUZZI et TURIAN, 1969, II).

d) L'immunoélectrophorégramme homologue pour la souche "fl" possède un seul arc de précipitation support d'activité malate-déshydrogénasique. Il s'agit d'une fraction à faible mobilité anodique formant une trainée de base, ligne de précipitation allongée désignée MDH₃. (planche 14, fig. d; photo 34).

L'homogénat de "fl" révélé par l'immunsérum anti-Nc contenant les 3 précipitines anti-MDH₁, anti-MDH₂ et anti-MDH₃ développe un seul arc de précipitation support d'activité malate-déshydrogénasique soit MDH₃.

PLANCHE 14

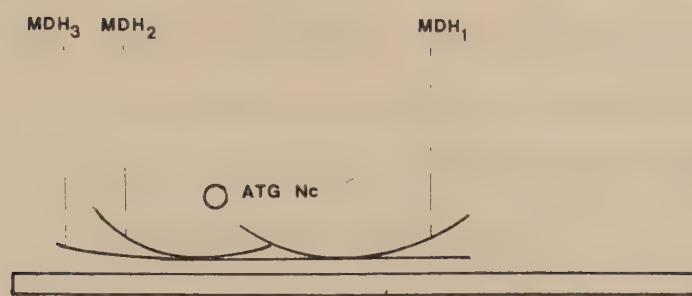
SCHEMA IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES COMPLEXES ISOENZY-
MES - ANTICORPS PUOR LA MDH

fig. a. Diagramme des complexes isoenzymes - antiisoen-
zymes de la MDH dans l'extrait de Nc révélé par
l'immunsérum homologue.

fig. b. Diagramme du complexe isoenzyme - antiisoenzyme
de la MDH dans l'extrait d'"amyc" révélé par
l'immunsérum homologue anti-"amyc".

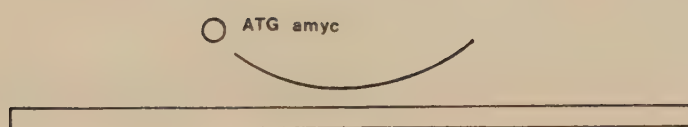
fig. c. Diagramme des complexes isoenzymes - antiisoen-
zymes de la MDH dans l'extrait d'"amyc"-ind.
révélé par l'immunsérum anti-Nc.

fig. d. Diagramme du complexe isoenzyme - antiisoenzyme
de la MDH dans l'extrait de "fl" révélé par
l'immunsérum homologue.



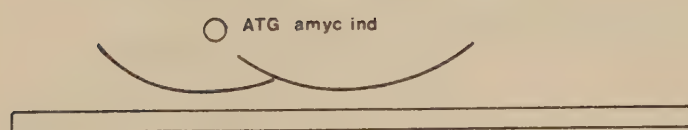
ATS Nc

a



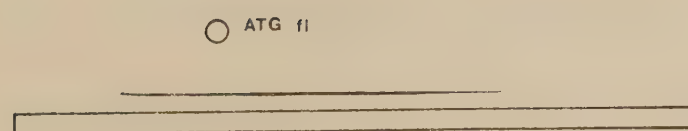
ATS amyc

b



ATS Nc

c



ATS fl

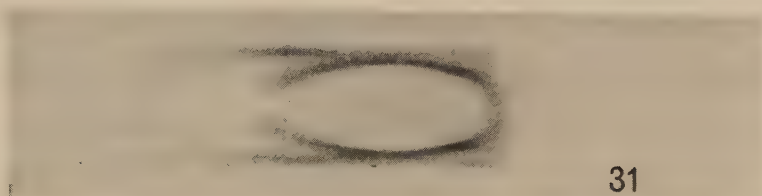
d

PHOTO 31. Caractérisation de l'activité de la MDH dans l'extrait de Nc après immunoélectrophorèse. Dans les deux rigoles nous avons déposé l'immunsérum homologue.

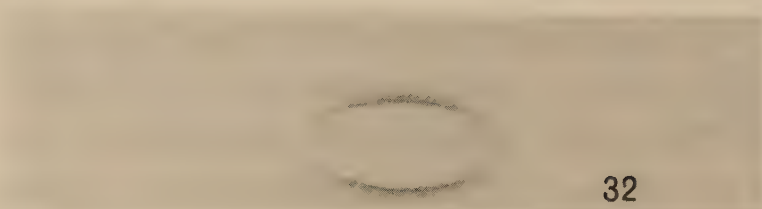
PHOTO 32. Caractérisation de l'activité de la MDH dans l'extrait d'"amyc" après immunoélectrophorèse. Dans les deux rigoles nous avons déposé l'immunsérum homologue.

PHOTO 33. Caractérisation de l'activité de la MDH dans les extraits Nc et "amyc"-ind. Dans les deux rigoles nous avons déposé l'immunsérum anti-Nc. Dans les deux puits externes, l'extrait antigénique de "amyc"-ind. Dans le puits central, extrait antigénique de Nc.

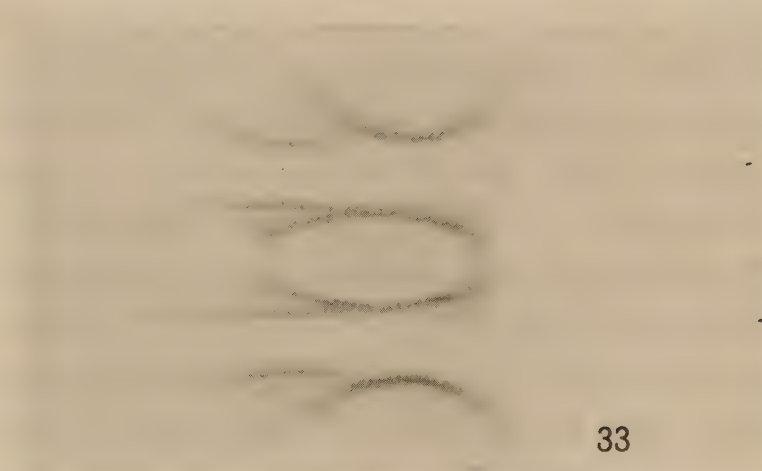
PHOTO 34. Caractérisation de l'activité de la MDH dans l'extrait de "fl" après immunoélectrophorèse. Dans les deux rigoles nous avons déposé l'immunsérum homologue.



31



32



33



34

4.3. C o n c l u s i o n e t d i s c u s s i o n

Les résultats présentés ci-dessus concernant la relation entre l'apparition et la caractérisation antigénique des isoenzymes de la MDH et l'induction à la conidiation du mutant "amyc" ("amyc"-ind.) sont résumés dans le tableau 11.

En ce qui concerne la souche sauvage, le spectre de trois isoenzymes antigéniques que nous avons pu établir se trouve être en accord avec les résultats obtenus par les différentes techniques d'électrophorèse (TSAO, 1962; LAYCOCK et coll., 1963; KITTO et coll., 1967; STRICKLAND et SHIELDS, 1967; BIENENGRÄBER et coll., 1968; MUNKRES, 1968) compte tenu que deux isoenzymes peuvent antigéniquement être identiques (PFLEIDERER, 1966).

En conclusion et sans prétendre avoir élucidé la base biochimique de la différenciation conidienne, nous pensons que la mise en évidence de l'étroite relation entre un isoenzyme de la MDH (MDH_2) et la conidiation a sans doute une signification importante pour la compréhension de la mosaïque de réactions physiologiques concourant à cette morphogénèse conidienne.

Reste ouvert maintenant un problème de compartimentation cellulaire, à savoir si la MDH_2 inductible "type acétate" correspond à la MDH cytoplasmique.

TABLEAU 11

ETUDE COMPAREE DES ACTIVITES ISOENZYMATIQUES DE LA MDH

Isoenzymes antigéniques de la MDH objectivés dans les extraits des souches Nc et "amyc" cultivées sur Ps (saccharose) et Pa (acétate).

Pour la souche "fl" nous avons rapporté seulement les résultats se référant aux activités décelées dans les extraits des cultures sur saccharose.

IMMUNSERUMS	ANTIGENES				
	ATG <u>Nc</u> s/Ps	ATG <u>Nc</u> s/Pa	ATG <u>"amyc"</u> s/Ps	ATG <u>"amyc"</u> s/Pa	ATG <u>"fl"</u> s/Ps
ATS <u>Nc</u>	MDH ₁	MDH ₁	MDH ₁	MDH ₁	-
	MDH ₂	MDH ₂	-	MDH ₂	-
	MDH ₃	MDH ₃	-	-	MDH ₃
ATS <u>"amyc"</u>	MDH ₁	MDH ₁	MDH ₁	MDH ₁	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
ATS "fl"	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	MDH ₃	MDH ₃	-	-	MDH ₃

BIBLIOGRAPHIE

ALBERGHINA F.A.M. & SUSKIND S.R. - 1967

Ribosomes and ribosomal protein from N. crassa
I. Physical, chemical, and immunochemical properties.
J. Bacteriol., 94: 630-649.

ANDRIEU S., BIGUET J. & LALOUX B. - 1968

Analyse immunoélectrophorétique comparée des structures
antigéniques de 17 espèces de dermatophytes.
Mycopath. Mycol. appl., 34: 161-185.

BARRAT, R.W., NEWMAYER, D., PERKINS, D.D., & GRANDJOBST, L., - 1954.

Map construction in Neurospora crassa.
Advan. Genet., 6: 1-93.

BARRAT R.W. - 1962

Origin of important wild type stocks of Neurospora crassa.
Neurospora Newsl., 2: 24.

BIENENGRÄBER, V., FRIEMEL, J., BROCK, J., KLEIST, H., & MÜCKE, D. - 1968

Proteine aus Neurospora crassa.
3. Agar-gel- und immunoelektrophoretische Analyse von Enzymen
und Isoenzymen bei verschiedenen Stämmen von Neurospora
crassa.
European J. Biochem. 6: 365-372.

BIGUET J., TRAN VAN KY P. & ANDRIEU S. - 1962

L'étude immunoélectrophorétique de la structure antigé-
nique des levures permet-elle de rattacher les formes
anascosporées aux formes ascosporées correspondantes?
Bull. Soc. Pharm. Lille, 2: 75-82

BIGUET J., ANDRIEU S. & LALOUX B. - 1965

Les affinités taxonomiques de Microsporium ferrugineum OTA, 1922 appréciées par l'analyse immunoélectrophorétique de sa structure antigénique.

Ann. Parasitol. hum. et comp., Paris, 40: 365-370.

BIGUET J., TRAN VAN KY P., ANDRIEU S. & FRUIT J. - 1965

Analyse immunoélectrophorétique des antigènes fongiques et systématiques des champignons. Répercussion pratique sur le diagnostic des Mycoses.

Mycopath. Mycol. appl., 26: 241-256.

BIGUET J. & TRAN VAN KY P. - 1966

Radioimmunoélectrophorèse et localisation des immunoglobulines sériques au cours des affections parasitaires essai préliminaire à propos de plusieurs cas d'aspergillomes bronchopulmonaires.

Rev. Immunol., Paris, 30: 165-172.

BIGUET J., TRAN VAN KY P., FRUIT J. & ANDRIEU S. - 1967

Identification d'une activité chymotrypsique au niveau de fractions remarquables de l'extrait antigénique d' Aspergillus fumigatus. Répercussions sur le diagnostic immunologique de l'aspergillose.

Rev. Immunol., Paris, 31: 317-328.

BJÖRKLUND, B. - 1952

Specific inhibition of precipitation as an acid in antigen analysis with the gel diffusion method. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 79: 319-324.

CHANG, L.O., SRB, A.M. & STEWARD, F.C. - 1962

Electrophoretic separations of the soluble proteins of Neurospora.

Nature, 193: 756-759.

COMBEPINE, G. - 1969.

Etude comparative de la transaminase alanine-glyoxylate et malate synthétase chez Neurospora crassa

Bull. soc. chim. biol., 51: 1309-1317.

DAVIS B. J. - 1964

Disc electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 404-427.

DICKER J. W., OULEVEY N. & TURIAN G. - 1969

Amino acid induction of conidiation and morphological alterations in wild type and morphological mutants of Neurospora crassa.

Arch. Mikrobiol. 65: 241-257.

DODGE, B.O. - 1930

Breeding albinistic strains of the Monilia bread mold.

Mycologia 22: 9-38.

FLAVELL R.B. & WOODWARD D.O. - 1969

The function, regulation and localization of multiple types of the glyoxylate shunt enzymes in Neurospora.

XIth Int. Bot. Congr. Seattle

GINDRAT, D., PEDUZZI, R., SIJAK, A. & TURIAN, G. - 1970

Caractérisation morphologique, chimique et sérologique d'un mutant albinos de Neurospora crassa Shear et Dodge isolé de semences de mâche (Valerianella olitoria (L.) Poll.)

Mycopath. Mycol. appl. (sous presse)

GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. - 1953

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta 10: 193-194.

GREGG, H.J. - 1961

Etude immunoélectrophorétique du Dictyostelium discoideum.

Develop. Biol., 3: 757-766.

GREGG, H.J. - 1968

Organization and synthesis in the cellular slime molds, Antigen synthesis and fate. 269.

The Fungi II

(Ed. AINSWORTH G.C. & SUSSMAN A.S.; Acad. Press. N.Y. and London 1966).

GRIGG, G.W. - 1960

The control of conidial differentiation in N. crassa.

J. gen. Microbiol., 22: 662-666.

HUNGATE, M.G.V. - 1945

A genetique study of albinos mutants of Neurospora crassa.

Thèse, Stanford University.

KITTO G.B., KOTTKE M.E., BERTLAND L.H. - 1967

Studies on malate dehydrogenases and aspartate aminotransferases from Neurospora crassa

Arch. Biochem. Biophys., 121: 224.

KORNBERG H.L. - 1958

Synthesis of cell constituents from acetate via the glyoxylate cycle.

Proc. of the 4th Int. Congress of Biochem., Vienna, XIII, 251-266.

KORNBERG, H.L. - 1966

Essays in Biochemistry, vol. 2, 1.

(Ed. CAMBELL P.N. et GREVILLE, G.D.; Academic Press, London).

LAYCOCK M.V., KØLMARK H.G., BOULTER D. - 1963

The separation of malic dehydrogenase isoenzymes of Neurospora crassa by polyacrylamide gel electrophoresis
Neurospora Newsl., 4: 20-21.

LISON, L. - 1960

Histochimie et cytochimie animales.

(Ed. Gauthier-Villars, Paris).

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L & RANDALL, R.J. - 1951

Protein measurment with Folin-phenol reagent.

J. biol. Chem. 193: 265-275.

MARKERT, C.L. & WHITT, G.S. - 1968

Molecular varieties of isozymes.

Experientia, 24: 977-991.

MÜLLER H.-L. & HIRSCH M. - 1967

Zur Antigenstruktur von Candida albicaus und Tropicalis.
Zentralbl. Bakt. Parasit. Infektions-krankh. Hyg.,
202: 247-256.

MUNKRES, K.D. - 1968

Genetic and epigenetic forms of malate dehydrogenase in
Neurospora.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 151: 294-306.

ORNSTEIN L. - 1964

Disc electrophoresis - I. Background and theory.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 321-349

OUCHTERLONY, O. - 1962

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II.
(Ed. Karger, Basel/New York).
Progr. Allergy, 6: 30-154.

OULEVEY, N. - 1969

inédit

OULEVEY-MATIKIAN, N. & TURIAN, G. - 1968

Contrôle métabolique et aspects ultrastructuraux de la
conidiation (macro-microconidies) de Neurospora crassa.
Arch. Mikrobiol., 60: 35-58.

PEDUZZI, R. & TURIAN, G. - 1969 I.

Etude immunochimique et électrophorétique de la conidia-
tion de Neurospora crassa. Experientia, 25: 1178-1180.

PEDUZZI, R. & TURIAN, G. - 1969 II.

Conidiation antigen and malate dehydrogenase isoenzyme
activities. Neurospora Newsl., 15: 24.

PEDUZZI, R. & TURIAN, G. - 1970

Analyse électrophorétique des protéines endocellulaires
solubles du type sauvage de Neurospora crassa comparées
à celles de l'un de ses mutants morphologiques.
C.R. Acad. Sc., Paris, 270: 196-198.

PFLEIDERER G., NEUFAHRT-KREILING A., KAPLAN R.W., & FORTNAGEL P.-1966

Biochemische und serologische Untersuchungen an multiplen
Formen der Hefenolase.
Biochem. Z., 346: 269-281.

RACUSEN, D. & JOHNSTONE, D.B. - 1961.

Estimation of protein in cellular material.
Nature, 191: 492-493.

RANZI, S. & CROISILLE, Y. - 1964.

Séminaires de la Chaire d'Embriologie expérimentale
du Collège de France.

Dans Méthodes nouvelles en Embryologie
(Ed. Hermann, Paris)

SCHEIDEGGER, J.J. - 1955

Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy, 7: 103-110.

SEELIGER, H.P.R. - 1955

Zur Anwendungsmöglichkeit der Präcipitation in Agar Gel
bei Antigenanalyse von Bakterien und Pilzen.
z.f. Hyg., 141: 110-121.

SEELIGER, H.P.R. - 1968

Recent applications of immunological techniques in the
diagnosis of the deep mycoses.

Ciba Fond. Symposium on Systemic Mycoses, 54-72.

(Ed. WOLSTENHOLME G.E.W. & PORTER R.; Churchill J. & A.
London).

SEELIGER, H.P.R. - 1968

Serology as an aid to taxonomy.

The Fungi III.

(Ed. G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN; Acad. Press N.Y.
and London 1968).

SONNEBORN, D.R. - 1962

Immunological analyses of the development of the cel-
lular slime mold, Dictyostelium discoideum.

Thèse, Brandeis University.

SONNEBORN, D.R., SUSSMAN, M., & LEVINE, L. - 1964

Serological analyses of cellular slime-mold development.
I. Changes in antigenic activity during cell aggregation.
J. Bacteriol., 87: 1321-1329.

SPÄRCK, J.V. - 1956

Environmental and genetic control of antigen differentiation in Neurospora Crassa.
Compt. rend. Lab. Carlsberg, Sér. physiol., 26: 349-361.

STRICKLAND W.N., SHIELDS M. - 1967

Identification of individual enzymes in crude extracts by acrylamide gel electrophoresis.
Neurospora Newsl., 12: 15.

TAKEUCHI, I. - 1963

Immunochemical and immunohistochemical studies on the development of the cellular slime mold Dictyostolium mucoroides.
Develop. Biol., 8: 1-26.

TRAN VAN KY, P., URIEL, J., & ROSE, F. - 1966

Caractérisation de types d'activités enzymatiques dans des extraits antigéniques d'Aspergillus fumigatus après électrophorèse et immunoélectrophorèse en agarose.
Ann. Inst. Pasteur, 111: 161-170.

TSAO, M.V. - 1962

Dehydrogenases of Neurospora crassa
Science 136: 42-43.

TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y., HAYASHI, S., AMEMIYA, S. & SANO, Y.-1957

Serological relationships among ascosporeogenous and aspo-rogenous yeasts. II. Antigenic structures of five species of the genus Saccharomyces.
Japan. J. Microbiol., 1: 205-212.

TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y., & KAWAKITA, S. - 1965

Significance of serological studies on yeasts
Mycopath. Mycol. appl., 26: 1-15.

TURIAN, G. - 1961

L'acétate et son double effet d'induction isocitratasique
et de différenciation conidienne chez les Neurospora.
C.R. Acad. Sci, 252: 1374-1376.

TURIAN, G. - 1965

Recherches sur la morphogénèse des Neurospora.
Arch. des Sciences, 18: 371-381.

TURIAN, G. - 1969

Différenciation fongique
(Ed. Masson & Cie., Paris)

TURIAN, G. & OULEVEY, N. - 1968

Réticulum endoplasmique et progression centripète du septum
interconidien chez un mutant morphologique de Neurospora
crassa.
Experientia, 24: 733.

URIEL, J. - 1963

Color reaction for the identification of antigen-antibody
precipitates in gel diffusion media.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 103: 936-957.

VANDERWINKEL, E. & VliegHERE, M. - 1968

Physiologie et génétique de l'isocitritase et des malate
synthases chez Escherichia coli.
European J. Biochem., 5: 81-90.

WEISS, B. - 1965

An electron microscope and biochemical study of N. crassa during development.

J. gen. Microbiol., 39: 85-94.

WEISS, B. & TURIAN, G. - 1966

A study of conidiation in Neurospora crassa.

J. gen. Microbiol., 44: 407-418.

WESTERGAARD, M. & MITCHELL, H.K. - 1947

Neurospora. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction.

Amer. J. Bot., 34: 573-577.

WHITNEY, P. J., VAUGHAN, J. G. & HEALE, J.B. - 1968

A disc electrophoretic study of the proteins of Verticillium albo-atrum, Verticillium dahliae, and Fusarium oxysporum with reference to their taxonomy.

J. Expt. Bot., 19: 415-426.

WILLIAMS, C.A. & TATUM, E.L. - 1961

Immunoelectrophoretic analysis of mutant and wild strains of Neurospora.

Proc. 5th Int. Congr. Biochem., Moscow, 405.

(Pergamon Press Ltd. Oxford, London, New York, Paris and Warsaw).

WILLIAMS, C.A., & TATUM, E.L. - 1966

Immunoelectrophoretic analysis of cytoplasmic proteins of Neurospora crassa.

J. gen. Microbiol., 44: 59-68.

WOLFF, E., GRABAR, P., RANZI, S. & CROISILLE, Y. - 1964

New Methods in Embryology

(Ed. Hermann, Paris).

T A B L E D E S M A T I E R E S

I	I N T R O D U C T I O N	1
II	M A T E R I E L E T M E T H O D E S	7
1.	M I C R O - O R G A N I S M E S E M P L O Y E S	7
1.1.	Souches de l'espèce <i>Neurospora crassa</i>	7
1.2.	Souche de l'espèce <i>Neurospora sitophila</i>	8
2.	M I L I E U D E C U L T U R E	10
2.1.	Milieu de base P	10
2.2.	Milieu Ps	11
2.3.	Milieu Pa	11
2.4.	Milieu Ps + ac.	11
2.5.	Milieu Ps + succ.	11
2.6.	Milieu Pa + succ.	12
3.	C O N D I T I O N S D E C U L T U R E E T D E R E C O L T E	13
4.	P R E P A R A T I O N D E S E X T R A I T S A N T I G E N I Q U E S P O U R L E S I N J E C T I O N S E T P O U R L E S T E S T S S E R O L O G I Q U E S	14
4.1.	Congélation - décongélation	15
4.2.	Lyophilisation	15
4.3.	Broyage et homogénéisation	16
4.4.	Centrifugation	17

5.	EVALUATIONS ET DOSAGES PROTEINIQUES DES EXTRAITS	18
5.1.	Méthode de Lowry	18
5.2.	Méthode avec la réaction du biuret	18
6.	PREPARATION DES ANTISERUMS	20
7.	IMMUNODIFFUSION	22
7.1.	Immunoélectrophorèse	22
7.2.	Test de double diffusion	23
7.3.	Test d'absorption	25
8.	ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE	26
9.	MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE APRES IMMUNOELECTROPHORESE	28
III	R E S U L T A T S	30
1.	ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SOLUBLES DU TYPE SAUVAGE DE NEUROSPORA CRASSA COMPAREE A CELLE DE DEUX DE SES MUTANTS MORPHOLOGIQUES	30

1.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide	30
1.1.1. Essais préliminaires	30
1.1.2. Dénombrement des fractions et estimation des similarités	33
1.1.3. Estimation quantitative comparée	36
1.2. Immunochimie	41
1.2.1. Double diffusion simple	42
1.2.1.1. Spécificité des anticorps	42
1.2.1.2. Dénaturation thermique	45
1.2.1.3. Réactions préliminaires	47
1.2.1.4. Réactions homologues et hétérologues	48
1.2.1.5. Réactions d'absorption	52
1.2.2. Immunoélectrophorèse	64
1.2.2.1. Réactions préliminaires	64
1.2.2.2. Réactions homologues	65
1.2.2.3. Réactions hétérologues	76
1.2.2.4. Réactions d'absorption	80
1.2.3. Immunodiffusion en gel d'agar après électrophorèse en gel de polyacrylamide	97
1.2.3.1. Composant différentiel d'"amyc" détecté par élec- trophorèse en gel de poly- acrylamide	97
1.2.3.2. Recherche de la propriété antigénique	98
1.2.3.3. Absorption de l'immunsérum anti-"amyc"	99

1.3. Conclusion et discussion	102
2. CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIC EN TANT QUE ARGUMENT TAXONOMIQUE POUR UN MUTANT ALBINOS NATUREL DE NEUROSPORA INCONNU GENETIQUEMENT	104
2.1. Analyse immunoélectrophorétique	105
2.2 Séparation des protéines sur colonne d'acrylamide	110
2.3. Conclusion et discussion	113
3. ETUDE IMMUNOCHIMIQUE ET ELECTROPHORETIC DE LA CONIDIATION	115
3.1. Contrôle de la croissance par des dosages totaux	117
3.1.1. Poids du mycélium lyophilisé	117
3.1.2. Taux protéinique	123
3.1.3. Conclusion et discussion	126
3.2. Mise en évidence par l'A.I.E. de modifications protéiniques dépendant du temps de croissance	127
3.3. Mise en évidence d'un constituant spécifique lié à l'événement morphogénétique	132
3.4. Conclusion et discussion	139

4.	ANTIGENE LIE A LA CONIDIATION SUPPORT D'UNE ACTIVITE ISOENZYMATIQUE	140
4.1.	Critères du choix du système enzyma- tique étudié	140
4.2.	Identification après A.I.E. en agarose de la malate déshydrogénase (MDH)	147
4.3.	Conclusion et discussion	154
	 B I B L I O G R A P H I E	 156

LISTE DES ABREVIATIONS EMPLOYEES

A.I.E.	Analyse immunoélectrophorétique
ATG	Antigènes
ATS	Antisérum
ATS... + ATG...	Ex. ATS Nc + ATG "amyc" antisérum de Nc épuisé par les antigènes d'"amyc"
B.S.A.	Bovine sérum albumine
C _{Nc}	Code établi pour le protéinogramme de Nc
dil.	Dilué
F.G.S.C.	Fungal Genetics Stock Center, (Dartmouth College, Hanover, N.H., U.S.A.)
MDH	Malate déshydrogénase
MDH ₁ , MDH ₂ , MDH ₃	Isoenzymes de la malate déshydrogénase antigéniquement différents
NAD	Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide
Ps	Milieu de base P + saccharose
Pa	Milieu de base P + acétate de sodium
Ps + ac.	Milieu de base P + saccharose et acétate de sodium

Ps + succ. Milieu de base P + saccharose et succinate de sodium

Pa + succ. Milieu de base P + acétate de sodium et succinate de sodium

Rp Rapport proportionnel

Souches:

al Mutants albinos de Neurospora crassa

al-Chg Albinos-Changins, mutant de Neurospora crassa

al-2 Albinos-2, mutant de Neurospora crassa

"amyc" "Amycelial", mutant de Neurospora crassa

"amyc"-ind. "Amycelial"-induit

"fl" "Fluffy", mutant de Neurospora crassa

Nc Type sauvage de Neurospora crassa

N. sito Type sauvage de Neurospora sitophila

Unités de mesure:

g gramme, unité de masse du système CGS.

g Initiale du mot "gravité", unité d'accélération de la pesanteur
(Introduit pour donner les caractéristiques d'une centrifugation; g vaut 981 cm/s^2 dans le système CGS).

μ Micro 10^{-6}

μ g Microgramme = 1/1'000'000 de gramme

μ l Microlitre = 1/1'000'000 de litre

$m\mu$ Millimicron = 1/1'000'000 de millimètre

mAmp. Milliampère; Amp. ou A unité d'intensité de
courant

Ω Ohm, unité de résistance électrique

T.C.A. Acide trichloracétique

LISTE DES PHOTOS

photo 1.	Aspect macroscopique des cultures des trois souches. 1a. Culture de Nc 1b. Culture de "fl" 1c. Culture d'"amyc"	32
photo 2.	Electrophorèse en gel de polyacry- lamide: fractionnement des protéines de Nc, "fl" et "amyc"	38
photo 3.	Test de la spécificité des anticorps 3a. Sérum de préimmunisation 3b. Immunsérum	44
photo 4.	Test des antigènes chauffés	46
photo 5.	Réactions croisées en double diffu- sion. Immunsérum anti-Nc	51
photo 6.	Réactions croisées en double diffu- sion. Immunsérum anti-"amyc"	51
photo 7.	Réactions croisées en double diffu- sion. Immunsérum anti-"fl"	51
photo 8.	Double diffusion, plaque d'absorption, réaction hétérologue. Immunsérum anti-Nc épuisé par "fl"	62

photo 9.	Double diffusion, plaque d'absorption, réaction hétérologue. Immunsérum anti-"amyc" épuisé par "fl"	62
photo 10.	A.I.E. de Nc en réaction homologue	73
photo 11.	A.I.E. de "fl" en réaction homologue	73
photo 12.	A.I.E. d'"amyc" en réaction homologue	73
photo 13.	A.I.E. de Nc en réaction homologue: immunsérum brut et immunsérum épuisé par "amyc"	90
photo 14.	A.I.E. de Nc en réaction homologue: immunsérum brut et immunsérum épuisé par "fl"	90
photo 15.	A.I.E. de "fl" en réaction homologue: immunsérum brut et immunsérum épuisé par Nc	92
photo 16.	A.I.E. de "fl" en réaction homologue: immunsérum brut et immunsérum épuisé par "amyc"	92
photo 17.	A.I.E. d'"amyc" en réaction homologue: immunsérum brut et immunsérum épuisé par "fl"	94
photo 18.	A.I.E. d'"amyc" en réaction homologue: immunsérum brut et immunsérum épuisé par Nc	94

photo 19.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide: fractionnement des protéines de Nc et d'"amyc"	101
photo 20.	Immunodiffusion après électrophorèse en gel de polyacrylamide	101
photo 21.	Double diffusion, plaque d'absorption, réaction homologue. Immunsérum anti-"amyc" épuisé par Nc	101
photo 22.	Double diffusion, plaque d'absorption, réaction hétérologue. Immunsérum anti-"amyc" épuisé par Nc	101
photo 23.	A.I.E. de al-Chg et al-2: immunsérum anti-Nc et immunsérum anti-"amyc"	109
photo 24.	A.I.E. de al-Chg et al-2: immunsérum anti-Nc et immunsérum anti-"fl"	109
photo 25.	A.I.E. de Nc: antigènes de cultures d'âges différents, immunsérum anti-Nc	131
photo 26.	A.I.E. de Nc en réaction hétérologue: immunsérum anti-"fl"	136
photo 27.	A.I.E. de Nc en réaction hétérologue: immunsérum anti-"amyc"	136

- photo 28. A.I.E. d'"amyc"-ind. Récupération
de l'arc no. 13.
Immunsérum anti-Nc et immunsérum
anti-"amyc" 136
- photo 29. A.I.E. d'"amyc". Preuve du substrat
inducteur. Antigènes de cultures fai-
tes sur les milieux: Ps, Pa + succ.
et Pa.
Immunsérum anti-Nc 146
- photo 30. A.I.E. d'"amyc". Preuve du substrat
inducteur. Antigènes de cultures fai-
tes sur le milieux: Pa + succ., Pa et
Ps + succ.
Immunsérum anti-Nc 146
- photo 31. Caractérisation de l'activité de la
MDH après A.I.E. de Nc en réaction
homologue 153
- photo 32. Caractérisation de l'activité de la
MDH après A.I.E. d'"amyc" en réaction
homologue 153
- photo 33. Caractérisation de l'activité de la
MDH après A.I.E. de Nc et "amyc"-ind.
Immunsérum anti-Nc 153
- photo 34. Caractérisation de l'activité de la
MDH après A.I.E. de "fl" en réaction
homologue 153

LISTE DES PLANCHES

- planche 1. Réactions croisées en double diffusion
fig. a Immunsérum anti-Nc
fig. b Immunsérum anti-"amyc"
fig. c Immunsérum anti-"fl" 50
- planche 2. Réactions homologues avec l'immunsérum anti-Nc absorbé.
fig. a Epuisement par les ATG de "fl"
fig. b Epuisement par les ATG d'"amyc" 56
- planche 3. Réactions homologues avec l'immunsérum anti-"amyc" absorbé.
fig. a Epuisement par les ATG de "fl"
fig. b Epuisement par les ATG de Nc 58
- planche 3a. Réactions hétérologues avec le immun-sérums anti-"amyc" et anti-Nc absorbés.
fig. a ATS Nc épuisé par ATG de "fl"
fig. b ATS "amyc" épuisé par ATG de "fl" 60
- planche 4. Schéma de l'A.I.E. des ATG de Nc révélés par l'ATS homologue 67
- planche 5. Schéma de l'A.I.E. des ATG de "fl" révélés par l'ATS homologue 69
- planche 6. Schéma de l'A.I.E. des ATG d'"amyc" révélés par l'ATS homologue 71
- planche 7. Schéma de l'A.I.E. des ATG de Nc révélés par l'ATS homologue absorbé.

fig. a	Epuisement par les ATG d'"amyc"	
fig. b	Epuisement par les ATG de "fl"	84
planche 8.	Schéma de l'A.I.E. des ATG de "fl" révélés par l'ATS homologue absorbé.	
fig. a	Epuisement par les ATG de Nc	
fig. b	Epuisement par les ATG d'"amyc"	86
planche 9.	Schéma de l'A.I.E. des ATG d'"amyc" ré- vélés par l'ATS homologue absorbé	
fig. a	Epuisement par les ATG de "fl"	
fig. b	Epuisement par les ATG de Nc	88
planche 9a.	Schéma de l'A.I.E. des ATG de N. sito révélés par l'ATS de Nc.	106
planche 10.	Estimation du poids lyophilisé:	
graphique a.	Courbes de croissance des cultures de Nc, "fl" et "amyc" sur milieu Ps.	
graphique b.	Courbes de croissance des cultures de Nc et d'"amyc" sur milieu Ps et milieu Pa.	120
planche 11.	Estimation du poids lyophilisé des cultures d'"amyc" sur différents mi- lieux	122
planche 12.	Estimation du taux protéinique:	
graphique a.	Rapport protéines to- tales/poids lyophilisé	
graphique b.	protéines solubles	125

planche 13. Schéma de l'A.I.E. des ATG de Nc appartenant à cultures d'âges différents.

fig. a. ATG d'une culture de 36 heures, ATS de Nc

fig. b. ATG d'une culture de 72 heures, ATS de Nc

129

planche 14. Schéma immunoélectrophorétique des complexes isoenzymes-anticorps pour la MDH.

fig. a. Diagramme de la réaction enzymatique dans les ATG de Nc révélés en réaction homologue

fig. b. Diagramme de la réaction enzymatique dans les ATG d'"amyc" révélés en réaction homologue.

fig. c. Diagramme de la réaction enzymatique dans les ATG de "amyc"-ind. révélés par l'ATS Nc

fig. d. Diagramme de la réaction enzymatique dans les ATG de "fl" révélés en réaction homologue

151

LISTE DES TABLEAUX

tableau 1	Capacités morphogénétiques des souches de <u>N. crassa</u> utilisées.	9
tableau 2	Comparaison des diagrammes électrophorétiques en gel d'acrylamide pour les souches Nc, "fl" et "amyc".	40
tableau 3	Réactions homologues et hétérologues en double diffusion avec les immunosérums absorbés.	63
tableau 4	Dénombrement des immunophorégrammes révélés par les immunosérums homologues.	74
tableau 5	Dénombrement des immunophorégrammes révélés par les immunosérums hétérologues.	78
tableau 6	Résumé des réactions croisées en A.I.E.	79
tableau 7	Réactions homologues et hétérologues en immunoélectrophorèse avec les immunosérums absorbés.	96
tableau 8	Réactions croisées en A.I.E. des souches albinos et <u>N. sitophila</u> .	107
tableau 9	Comparaison des diagrammes électrophorétiques en gel d'acrylamide pour les souches albinos et <u>N. sitophila</u> .	112

tableau 10	Comparaison des diagrammes électrophorétiques en gel d'acrylamide pour les souches Nc, "amyc" et "amyc ^L ind.	138
tableau 11	Etude comparée des activités isoenzymatiques de la MDH.	155

